



Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique : Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique de deux composés actifs

Amandine Andraud-Dieu

► To cite this version:

Amandine Andraud-Dieu. Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique : Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique de deux composés actifs. Biologie moléculaire. Université de Limoges, 2015. Français. NNT : 2015LIMO0029 . tel-01184892

HAL Id: tel-01184892

<https://theses.hal.science/tel-01184892>

Submitted on 18 Aug 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 523 « GAY LUSSAC »

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (EA 1069)

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Chimie appliquée / Chimie des Substances Naturelles

présentée par

Amandine DIEU

le 01 Juin 2015

Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique

Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique

de deux composés actifs

Thèse dirigée par Vincent GLOAGUEN,

Vincent CHALEIX et Marion MILLOT

JURY :**Rapporteurs**

M. Joël Boustie, Professeur, UMR CNRS 6226, Université de Rennes I

M. Erwann Guénin, Maître de Conférences HDR, UMR 7244 CNRS, Université Paris 13

Examineurs

M. Stanley Lutts, Professeur, ELI-A, Université catholique de Louvain

M. Vincent Gloaguen, Professeur, EA 1069, Université de Limoges

M. Vincent Chaleix, Professeur, EA 1069, Université de Limoges

Mme Marion Millot, Maître de conférences, EA 1069, Université de Limoges

Invité

M. David Marionnet, Docteur et Directeur des Jardins de Sothys

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 523 « GAY LUSSAC »

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (EA 1069)

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Chimie appliquée / Chimie des Substances Naturelles

présentée par

Amandine DIEU

le 01 Juin 2015

Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique

Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique

de deux composés actifs

Thèse dirigée par Vincent GLOAGUEN,

Vincent CHALEIX et Marion MILLOT

JURY :**Rapporteurs**

M. Joël Boustie, Professeur, UMR CNRS 6226, Université de Rennes I

M. Erwann Guénin, Maître de Conférences HDR, UMR 7244 CNRS, Université Paris 13

Examineurs

M. Stanley Lutts, Professeur, ELI-A, Université catholique de Louvain

M. Vincent Gloaguen, Professeur, EA 1069, Université de Limoges

M. Vincent Chaleix, Professeur, EA 1069, Université de Limoges

Mme Marion Millot, Maître de Conférences, EA 1069, Université de Limoges

Invité

M. David Marionnet, Docteur et Directeur des Jardins de Sothys

« La nature est éternellement jeune, belle et généreuse. Elle verse la poésie et la beauté à tous les êtres, à toutes les plantes, qu'on laisse s'y développer. »

George Sand



Photos : O. Gonnet et J.-P. Gavériaux (Association Française de Lichénologie)

« Pas un prestidigitateur n'égale la nature : elle opère sous nos yeux, en pleine lumière, et cependant il n'y a pas moyen de pénétrer ses trucs. »

Rémy de Gourmont

Remerciements

La thèse, une grande et belle aventure... Qui, au-delà de l'aspect scientifique, commence avant tout par des rencontres avec des personnes passionnées et passionnantes... Une aventure humaine riche en échanges... Des moments de convivialité gravés à jamais dans ma mémoire... J'espère, dans ces remerciements, n'oublier aucune des personnes qui, de près ou de loin, ont contribué au bon déroulement de ma thèse...

Je souhaite remercier vivement le **Professeur Joël Boustie** et le **Docteur Erwann Guénin**, qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail. Ma reconnaissance va également au **Professeur Stanley Lutts** qui me fait l'honneur d'être examinateur et de présider ce jury. Enfin, toute ma gratitude va à **M. David Marionnet**, Docteur et Directeur des Jardins de Sothys, pour avoir accepté notre invitation.

Je tiens à remercier le **Professeur Vincent Sol**, Directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles. Vincent, vous faites partie de ceux qui ont éveillé en moi un intérêt et un goût certain pour la chimie... Merci pour votre sympathie, votre confiance, votre disponibilité et de m'avoir permis de m'ouvrir à d'autres horizons en participant à des congrès nationaux et internationaux.

Je remercie très chaleureusement « mes chefs » :

Au **Professeur Vincent Gloaguen**... Depuis de nombreuses années maintenant, vous m'avez toujours encouragée. Merci pour vos qualités humaines, vos précieux conseils dans tant de domaines... Vous avez toujours été disponible pour moi et su trouver les mots qu'il fallait même dans les petits moments de découragement... Merci pour votre réactivité, votre plume, votre confiance et votre soutien sans faille, je vous dois beaucoup... Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect...

Au **Professeur Vincent Chaleix**... Je crois que tu es celui qui a eu la tâche la plus difficile ! La synthèse organique était pour moi le plus gros challenge de ma thèse et j'espère avoir été à la hauteur... Même si tout n'a pas fonctionné aussi bien et aussi rapidement qu'on le souhaitait ! J'ai beaucoup appris à ton contact et tu fais toi aussi partie de ceux, qui tout au long de mon parcours universitaire, ont su me faire redécouvrir et apprécier la chimie... Merci pour ta patience, ton optimisme à toute épreuve (je suis persuadée que tu viendras à bout de cette xanthone...), et d'avoir accepté d'encadrer une biologiste sur ce projet !

Au **Docteur Marion Millot**... Nos premiers moments passés ensemble ont été riches en efforts physiques ! Equipées de nos chaussures de randonnée, à nous les longues promenades dans les bois et crapahutages en tous genres pour récolter les précieux lichens... Sans boussole, cela n'a pas toujours été facile et nous a parfois valu de petits (voire d'énormes...) détours ! Merci pour ta confiance, pour tes conseils, et pour les moments passés à éplucher les spectres dans la bibliothèque... Tu m'as communiqué ta passion pour ces organismes qui recèlent bien des secrets... Je suis arrivée en ne connaissant de la phytochimie que le nom, mais après cette expérience, continuer dans cette voie est pour moi une évidence.

Un merci particulier au **Professeur Jean-Luc Duroux** pour son accueil lors de mon arrivée à la Faculté de Pharmacie.

J'adresse également mes remerciements au **Professeur Albert-José Chulia** qui m'a accueillie dans le service de Pharmacognosie. **Professeur Lengo Mambu**, merci pour vos conseils avisés, votre rigueur et l'intérêt que vous avez porté à mes travaux.

Mes remerciements vont également au **Docteur Claude-Yves Couquet** pour son accueil au Laboratoire Départemental, ainsi qu'au **Docteur Marie-Jeanne Cornuéjols**.

Je remercie le **Conseil Régional du Limousin** pour le financement des trois années de thèse, ainsi que l'**Université de Limoges** pour le financement du poste d'ATER qui m'a permis de terminer mon travail dans des conditions optimales.

Ma reconnaissance va à tous les membres du Laboratoire, qui de près ou de loin, ont apporté leur pierre à ce travail de thèse, tant sur le plan moral que scientifique... Une pensée particulière pour le **Professeur Rachida Zerrouki** : un grand merci pour votre investissement et vos encouragements du début à la fin de ma thèse... J'adresse également mes remerciements au **Professeur Michel Guilloton** pour la correction de l'article.

Merci aussi à **Stéphanie L.** pour tous ses conseils et nos nombreux échanges pendant mon contrat d'ATER, 6 mois au cours desquels j'ai pu découvrir avec plaisir l'univers de l'enseignement.

Michèle et **Dorothée**, merci pour votre bonne humeur, vos sourires... J'ai aimé me poser sur votre « tabouret de compét' » pour papoter avec vous. Merci « Dodo » pour ton agréable compagnie et tous tes conseils avant, pendant et après les TP ! Une belle expérience pour moi à tes côtés !

Un grand merci au **Professeur Philippe Bressollier** pour son accueil à l'IUT. Monsieur le **Docteur Romain V.** (notre modèle à tous !) et **Karine G.**, merci pour votre convivialité et votre disponibilité. Travailler à vos côtés a été un vrai plaisir ! Un merci tout particulier **Docteur Tan Ouk** pour tes conseils et le temps que tu as consacré à ce manuscrit.

Une pensée particulière pour **Hélène** et **Oriane**... Comment oublier les râtaux, les centaines d'épendorfs, les charlottes, les boîtes de Pétri et milieux de culture en tous genres... Merci les filles pour votre agréable compagnie !

Merci aussi à tous les « pharmaciens du labo » pour leur accueil (**Christelle, Catherine, Alain, David, Bertrand, Aurélie G., Aline, Frédérique, Claude**...). Je tiens également à remercier les filles du 4^{ème}, **Roselyne** et **Martine**, pour leur gentillesse et leur accueil chaleureux... Merci pour votre aide et vos conseils... Une pensée également pour **Michelle Soumagnas**...

Un grand merci au **Docteur Yves Champavier** (le super héros de la RMN !) pour les analyses et le temps consacré à l'interprétation des spectres... Mais bien au-delà, merci pour ta disponibilité, ton soutien et les discussions improvisées dans l'encadrement de ta porte... Ton aide m'a été précieuse...

Merci aux **Docteurs Philippe Jéhan** (Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest, Rennes) et **Cyril Colas** (Institut de Chimie Organique et Analytique, Orléans) pour les analyses par spectrométrie de masse.

Merci également à **Monsieur Jean-Pierre Picot**, Directeur de la société IDbio, ainsi qu'à **Julien Poupon, Alexia Forestier** et **Aïna Queiroz**, pour la confiance qu'ils m'ont accordée au cours du projet partenarial avec le LCSN. **Carine**, un clin d'œil spécial pour toi, merci pour tous les moments passés ensemble à peaufiner les extractions et les CCM, et aussi pour tes super madeleines... !

Merci à tous mes collègues, en particulier les doctorants, présents et passés, les post-doctorants et autres « hébergés du laboratoire » pour leur bonne humeur... A mon ex-coloc' de bureau **Manu** (ex-Président du TRG !), **Stéphanie V.** « Mamy », **Stéphanie B.** (la troisième MéliGir!...), les gabonnais « **Jean-Jean** » et « **Mak** », **Jihane, Shihong, Olivier, Idelette, Benjamin R.** (Président du TRG !), **Youness, Lamia, Ahmad, Nicolas G., Jean-Pierre**, mon nouveau coloc' de bureau **Olivier**... et tous les autres... une pensée particulière pour tous ceux qui vont aussi soutenir cette année...

Julien V., une spéciale dédicace pour toi Monsieur le Briviste ! Merci pour tous tes conseils à la paillasse, dans l'encadrement de ta porte, et pour ton soutien sans faille. J'ai vraiment apprécié travailler à tes côtés et je te souhaite bon vent en Corrèze !

Une pensée amicale pour mes compagnons de « gamelles & mots fléchés » : **Monsieur Astier**, Vice-Président du TRG ! Je compte sur toi pour faire perdurer la tradition... **Christelle** « Cricri », merci pour ma gamelle d'anniversaire ! **Amandine B.**, c'est bientôt ton tour, et je pense bien fort à toi Poulette !

Anaïs et **Carmen**, mes super voisines de bureau et de « tard le soir » ! Les filles, vous avez bien du mérite... Anaïs, merci pour ton aide et tes précieux conseils de biologiste ! Carmen, garde toujours ta bonne humeur et ton beau sourire...

Un grand merci au **Docteur Robert Granet**, toujours disponible pour des discussions improvisées, qu'elles soient scientifiques, historiques ou culinaires... Notre « super Jocker » des mots fléchés n'a jamais failli ! Vos connaissances intarissables dans tant de domaines forcent le respect...

Merci aussi aux stagiaires **Eddy, Ruobing, Chloé, Sophie** et **Grégory** ; un grand merci en particulier à **Meggy**, pour tout le travail que tu as accompli... Je te souhaite le meilleur pour l'avenir, qu'il soit pour toi aussi doux que les plumes de la scène... !

Une spéciale dédicace à mes « copines de pharma », **Rokhaya** et **Laetitia**. Merci pour ces moments passés autour de nos gamelles, goûters et autres sorties gourmandes... !

Rokhaya, merci pour ta joie de vivre et ton humour. Avec toi, nous avons eu notre dose quotidienne de fous rires !

Laetitia, ma super coloc' de bureau et plus encore, merci pour ta complicité, les déjeuners passés ensemble (plus ou moins réussis selon les adresses !), les macarons grignotés dans les boutiques... Mais aussi pour tes conseils techniques si précieux et pour le temps passé à réparer l'HPLC... Le binôme Mario-Luigi fonctionne du tonnerre... !

Que de bons souvenirs avec vous les filles...

Une pensée pour les **amis précieux** des quatre coins de la France (de Limoges à Périgueux, de Niort à Colmar, en passant par Grenoble, Toulon et Perpignan), jusqu'en Suisse et en Belgique...

Ma profonde reconnaissance va naturellement à **mes parents** et à **mon frère** qui m'ont soutenue et encouragée... Vous avez toujours cru en moi... Je vous aime fort. Une pensée aussi pour ma famille proche : **mes grands-parents, Jacques, Annette, Léna, Christophe** et **Aurélié**...

Enfin, un grand merci à ma moitié, mon équilibre, qui me soutient, me complète et me reconforte chaque jour depuis déjà de merveilleuses années. **Benoît**, tu sais combien je t'aime... A toute la vie... Et en route pour une merveilleuse aventure... !

Droits d'auteurs



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** » disponible en ligne :

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Valorisation des travaux de thèse

Publication

- Dieu, A.; Millot, M.; Champavier, Y.; Mambu, L.; Chaleix, V.; Sol, V.; Gloaguen, V. (2014). Uncommon Chlorinated Xanthone and Other Antibacterial Compounds from the Lichen *Cladonia incrassata*. *Planta Medica* 80, 1-5.

Communications orales

- Antibacterial compounds from *Cladonia incrassata*. A. Dieu, M. Millot, Y. Champavier, A. Mambu, V. Chaleix, V. Sol, V. Gloaguen. International Symposium AFERP & STOLON, Bruxelles, 22-24 mai 2013.
- Synthèse d'une molécule d'intérêt d'origine lichénique : l'acide usnique. A. Dieu, M. Millot, Y. Champavier, A. Mambu, V. Chaleix, V. Sol, V. Gloaguen. Congrès de la Société Chimique de France, Limoges, 29-31 janvier 2014.
- Composés antibactériens isolés des lichens *Cladonia incrassata*, *Usnea florida* et *Flavoparmelia caperata*. 24^{èmes} Journées Scientifiques STOLON, Limoges, 27-29 août 2014.

Communications affichées

- Antimicrobial activity of *Cladonia incrassata* acetone extract. A. Dieu, M. Millot, Y. Champavier, J.-A. Chulia, J. Vergnaud, V. Chaleix, P. Bressollier, V. Sol, V. Gloaguen. *Planta Medica* 2012 ; 78-PI461 DOI : 10.1055/s-0032-1321148. International Congress on Natural Products Research, New York City, 8 juillet-01 août 2012.
- Antibacterial compounds from *Cladonia incrassata*. A. Dieu, M. Millot, Y. Champavier, A. Mambu, V. Chaleix, V. Sol, V. Gloaguen. International Symposium AFERP & STOLON, Bruxelles, 22-24 mai 2013.
- La cladoxanthone A : un composé antibactérien original isolé du lichen *Cladonia incrassata*. A. Dieu, M. Millot, Y. Champavier, A. Mambu, V. Chaleix, V. Sol, V. Gloaguen. Congrès de la Société Chimique de France, Limoges, 29-31 janvier 2014.
- Composés antibactériens isolés des lichens *Cladonia incrassata*, *Usnea florida* et *Flavoparmelia caperata*. 24^{èmes} Journées scientifiques STOLON, Limoges, 27-29 août 2014.
- Bio-guided isolation of antioxidant compounds in a *Fagopyrum esculentum* active. C. Quenel Quériaud, A. Dieu, M. Millot, J. Poupon, A. Mambu. 28th congress IFSCC, Paris, 27-30 octobre 2014.

Liste des abréviations

ABTS	Acide 2,2-azino-bis 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
AcOEt	acétate d'éthyle
[α]_D	pouvoir rotatoire
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF	Acide Formique
ANS	ANisaldéhyde Sulfurique
ARN	Acide RiboNucléique
AU	Acide Usnique
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-méthoxyphénol
CCC	Chromatographie Circulaire Centrifuge
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CH	Centésimale Hahnemannienne
CiA	extrait acétonique de <i>Cladonia incrassata</i>
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CLHP-UVBD	analyse par couplage CLHP-détection UltraViolet à Barette de Diodes
CLMP	Chromatographie Liquide Moyenne Pression
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMI₅₀	Concentration Minimale Inhibant 50 % de la croissance microbienne
CoA	Coenzyme A
COSY	COrrrelation SpectroscopY
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge
CPG-SM	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
DCM	dichlorométhane
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
éq.	équivalent
FcA	extrait acétonique de <i>Flavoparmelia caperata</i>
h	heure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IES	Ionisation ElectroSpray
IR	InfraRouge
IRTF	InfraRouge à Transformée de Fourier
<i>J</i>	constantes de couplage
Me	méthyle

MeOH	méthanol
min	minute
MTT	bromure de MéthylThiazolyl-Tétrazolium
m/z	rapport masse sur charge
NCS	N-chlorosuccinimide
PF	Point de Fusion
ppm	partie par million
PR	Pouvoir Rotatoire
R²	coefficient de corrélation
Rdt	rendement
R_f	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SMHR	Spectrométrie de Masse Haute Résolution
TA	Température Ambiante
THF	tétrahydrofurane
TS	milieu de culture Tryptone Soja
UfA	extrait acétonique d' <i>Usnea florida</i>
UFC	Unité Formant Colonie
UV	UltraViolet

Sommaire

Introduction.....	1
Partie A. Les lichens & leurs métabolites - Propriétés biologiques - Voies de biosynthèse.....	7
I. Les lichens.....	7
I.1. Ecologie et répartition	7
I.2. Morphologie et anatomie des thalles lichéniques	9
I.3. Constituants des lichens	11
I.4. Reproduction des lichens.....	12
I.5. Echanges nutritionnels entre les partenaires.....	14
I.6. Utilisations des lichens	16
I.6.1. Propriétés médicales et pharmacologiques.....	16
I.6.2. Bioindicateurs de pollution	17
I.6.3. Autres applications.....	17
II. Les métabolites secondaires lichéniques	19
II.1. Voies de biogenèse des métabolites secondaires	19
II.1.1. Voie de l'acide mévalonique	20
II.1.2. Voie de l'acide shikimique	21
II.1.3. Voie de l'acétate polymalonate	22
II.2. Principales familles de polycétides aromatiques.....	24
II.2.1. Les depsides, depsidones, depsones et diphényléthers	24
II.2.1.1. Les depsides	24
II.2.1.2. Les depsidones.....	25
II.2.1.3. Les depsones et diphényléthers	26
II.2.2. Les dibenzofuranes et l'acide usnique	27
II.2.3. Les anthraquinones, naphtoquinones, chromones et xanthones	30
II.2.3.1. Les anthraquinones et naphtoquinones.....	30
II.2.3.2. Les chromones	32
II.2.3.3. Les xanthones	33
II.2.4. Les phtalides.....	37
II.3. Extraction, purification et identification des métabolites secondaires.....	38
II.3.1. Principales méthodes d'extraction.....	38
II.3.2. Purification des extraits et isolement des composés.....	39
II.3.2.1. Techniques de purification	39
II.3.2.2. Suivi de la purification.....	40
II.3.2.3. Fractionnement bioguidé des extraits	40
II.3.3. Caractérisation et identification structurale des métabolites isolés	42
II.4. Propriétés biologiques et applications des métabolites secondaires lichéniques	42
II.4.1. Rôles écologiques	42
II.4.1.1. Activités photoprotectrice et antioxydante.....	43
II.4.1.2. Tolérance à la pollution	44
II.4.1.3. Effet allélopathique : activités phytotoxique et antimicrobienne	45

II.4.1.4. Activité antiherbivore	46
II.4.2. Propriétés biologiques : cas de l'acide usnique	48
II.4.2.1. Activité antimicrobienne.....	48
II.4.2.2. Activité antioxydante	54
II.4.2.3. Autres activités	54
II.4.3. Utilisation de l'acide usnique dans l'industrie cosmétique.....	57
II.4.4. Autres utilisations.....	60
Objectif du travail	61
Partie B. Etude phytochimique de trois espèces de lichen - Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits et des métabolites isolés.....	65
I. Choix des espèces.....	65
I.1. Récolte et identification des lichens.....	66
I.2. Choix du solvant et du type d'extraction.....	67
I.2.1. Extractions classiques.....	67
I.2.2. Extractions séquentielles.....	70
I.2.3. Choix de la méthode d'extraction	72
I.3. Extractions par l'acétone	72
I.3.1. Comparaison des pourcentages d'extraction	72
I.3.2. Comparaison des profils chimiques	73
I.4. Description des espèces sélectionnées	74
I.4.1. <i>Cladonia incrassata</i> Flörke	76
I.4.2. <i>Usnea florida</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	77
I.4.3. <i>Flavoparmelia caperata</i> (L.) Hale	79
II. Préparation et analyse des extraits acétoniques.....	82
II.1. Extraction par l'acétone.....	82
II.2. Analyse des extraits acétoniques	83
II.2.1. Analyse par CCM	83
II.2.2. Analyse par CLHP-UVBD	84
II.2.3. Dosage de l'acide usnique dans les extraits.....	87
II.2.4. Conclusion	88
III. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits	88
III.1. Méthode adaptée du challenge test	88
III.1.1. Activité antibactérienne sur <i>Staphylococcus aureus</i>	89
III.1.2. Activité antifongique sur <i>Candida albicans</i>	91
III.1.3. Activité antifongique sur <i>Aspergillus brasiliensis</i>	92
III.1.4. Corrélation entre la quantité d'acide usnique présente dans les extraits & l'activité antimicrobienne	93
III.1.5. Discussion.....	95
III.2. Détermination des pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne et des concentrations minimales inhibitrices.....	100
III.3. Mise en évidence des composés antibactériens par bioautographie	102
III.4. Conclusion sur l'activité antimicrobienne des extraits.....	104
IV. Fractionnement bioguide des extraits	105
IV.1. Purification de l'extrait de <i>C. incrassata</i> Flörke.....	105

IV.1.1. Métabolites isolés	107
IV.1.1.1. Les dibenzofuranes et l'acide usnique.....	107
IV.1.1.2. Les depsides.....	111
IV.1.1.3. Une xanthone nouvelle : la cladoxanthone A (Ci6)	113
IV.1.1.4. Composé Ci7	119
IV.1.2. Discussion sur les composés isolés de <i>C. incrassata</i>	120
IV.2. Purification de l'extrait d' <i>U. florida</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	122
IV.2.1. Métabolites isolés	123
IV.2.1.1. L'acide (+)-usnique (Uf1).....	123
IV.2.1.2. Les depsides.....	124
IV.2.1.3. Les depsidones.....	125
IV.2.1.4. Le 5,7-dihydroxy-6-méthylphthalide (Uf3)	126
IV.2.2. Discussion sur les composés isolés d' <i>U. florida</i>	127
IV.3. Purification de l'extrait de <i>F. caperata</i> (L.) Hale.....	129
IV.3.1. Métabolites isolés	130
IV.3.1.1. L'acide (+)-usnique (Fc1).....	130
IV.3.1.2. L'acide protocétrarique (Fc2)	131
IV.3.1.3. L'acide capératique (Fc3).....	131
IV.3.1.4. Le peroxyde d'ergostérol (Fc4).....	132
IV.3.2. Discussion sur les composés isolés de <i>F. caperata</i>	133
V. Conclusion generale sur le fractionnement bioguide des extraits	135
VI. Evaluation de l'activité antibacterienne des composés isolés.....	139
VI.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par bioautographie.....	139
VI.1.1. Métabolites de <i>C. incrassata</i> Flörke.....	139
VI.1.2. Métabolites d' <i>Usnea florida</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.....	140
VI.1.3. Métabolites de <i>Flavoparmelia caperata</i> (L.) Hale.....	141
VI.2. Détermination des pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne et des concentrations minimales inhibitrices.....	143
VI.3. Conclusion sur l'activité antibactérienne des composés isolés	147
VII. Conclusion generale sur l'activité des extraits et des metabolites isolés.....	149

Partie C. Approche synthétique de deux composés actifs : l'acide usnique & la cladoxanthone A..

I. Synthèse de l'acide usnique	156
I.1. Rappels bibliographiques.....	156
I.1.1. Modifications structurales de l'acide usnique	156
I.1.2. Synthèse de l'acide usnique	158
I.1.3. Préparation du précurseur : la méthylphloroacétophénone	159
I.1.3.1. Acétylation suivie de la méthylation.....	160
I.1.3.2. Méthylation suivie de l'acétylation.....	162
I.2. Objectif du travail et stratégie de synthèse.....	164
I.3. Obtention de la méthylphloroacétophénone.....	164
I.3.1. Synthèse à partir du phloroglucinol : stratégie S1	165
I.3.1.1. Formylation du phloroglucinol.....	166
I.3.1.2. Réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde	167

I.3.1.3. Acétylation du méthylphloroglucinol.....	170
I.3.2. Synthèse à partir de la phloroacétophénone.....	172
I.3.2.1. Stratégie S2	173
I.3.2.2. Stratégie S3 : méthylation par l'iodométhane.....	174
I.3.3. Discussion - conclusion.....	175
I.4. Réaction de couplage oxydant.....	177
I.4.1. Choix du catalyseur	177
I.4.2. Réaction de Barton <i>et al.</i>	180
I.4.3. Essais de couplage en présence de la tétra(dichloro-phényl)porphyrine.....	182
I.4.4. Discussion-conclusion	183
I.5. Bilan sur la synthèse de l'acide usnique	184
II. Synthèse de la cladoxanthone A.....	186
II.1. Synthèse de xanthones : rappels bibliographiques	186
II.1.1. Réaction de Grover, Shah et Shah (GSS)	186
II.1.2. Synthèse <i>via</i> un intermédiaire benzophénone	188
II.1.3. Synthèse <i>via</i> un intermédiaire diaryléther.....	190
II.2. Stratégie de synthèse	192
II.3. Stratégie S4.....	193
II.3.1. Synthèse à partir du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle	193
II.3.1.1. Méthode « classique » de formylation	194
II.3.1.2. Méthode de formylation adaptée de Kiran et Mahadevan (2006)	196
II.3.2. Synthèse à partir du 4-chloro-3-méthylbenzoate de méthyle.....	197
II.3.2.1. Nitration.....	197
II.3.2.2. Réduction	199
II.3.2.3. Diazotation - hydroxylation.....	201
II.3.3. Discussion - conclusion.....	203
II.4. Stratégie S5.....	205
II.4.1. Estérification.....	205
II.4.2. Chloration.....	206
II.4.3. Discussion - conclusion.....	213
II.5. Bilan sur la synthèse de la cladoxanthone A	214
Conclusion & Perspectives	219
Partie D. Données expérimentales	227
I. Réactifs et solvants.....	227
II. Méthodes de séparation.....	228
II.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM) préparative	228
II.2. Chromatographie Liquide Moyenne Pression (CLMP).....	228
II.3. Chromatographie sur colonne sous pression : chromatographie éclair	228
II.4. Chromatographie Circulaire Centrifuge (CCC).....	229
II.5. Chromatographie liquide d'exclusion stérique sur colonne ouverte	229
III. Appareillages & techniques analytiques	229
III.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	229
III.2. Chromatographie liquide haute performance avec détecteur à barrette de diodes (CLHP-UVBD).....	229

III.3. Chromatographie en Phase Gazeuse avec détecteur de Masse (CPG-SM).....	230
III.4. Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	230
III.5. Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR).....	230
III.6. Spectrophotométrie Ultra-Violet (UV)	230
III.7. Spectrométrie Infra-Rouge (IR).....	231
III.8. Point de Fusion (PF)	231
III.9. Pouvoir Rotatoire (PR)	231
IV. Etude phytochimique des trois espèces de lichen	231
IV.1. Choix des espèces.....	231
IV.1.1. Récolte des lichens.....	231
IV.1.2. Identification des lichens	232
IV.1.2.1. Observations à la loupe binoculaire	233
IV.1.2.2. Réactions thallines.....	233
IV.2. Choix du solvant et du type d'extraction	233
IV.2.1. Extractions classiques	233
IV.2.2. Extractions séquentielles	234
IV.2.3. Extractions par l'acétone sur les 17 espèces récoltées.....	234
IV.3. Préparation et analyse des extraits acétoniques	235
IV.3.1. Protocole d'extraction	235
IV.3.2. Analyse des extraits par CCM et CLHP-UVBD	235
IV.3.3. Dosage de l'acide usnique dans les extraits par CLHP-UVBD	235
IV.3.4. Dosage de l'acide didymique dans l'extrait de <i>C. incrassata</i>	236
IV.4. Fractionnement bioguidé des extraits	237
IV.4.1. Purification de l'extrait de <i>C. incrassata</i> Flörke	237
IV.4.2. Purification de l'extrait d' <i>Usnea florida</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	237
IV.4.3. Purification de l'extrait de <i>Flavoparmelia caperata</i> (L.) Hale	238
IV.5. Description des produits isolés	239
V. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits & des composés isolés	254
V.1. Activité antimicrobienne des extraits par méthode adaptée du challenge test	254
V.2. Détermination des pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne et des CMI des extraits et des composés isolés sur <i>Staphylococcus aureus</i>	255
V.3. Technique de bioautographie sur <i>S. aureus</i>	256
V.4. Analyses statistiques	257
VI. Obtention des précurseurs de l'acide usnique & de la cladoxanthone A	258
VI.1. Acide usnique	258
VI.1.1. Synthèse du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (1)	258
VI.1.2. Synthèse du méthylphloroglucinol (2)	259
VI.1.3. Synthèse du 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (4)	260
VI.1.4. Synthèse de la méthylphloroacétophénone (3)	261
VI.1.4.1. Par acétylation du méthylphloroglucinol	261
VI.1.4.2. Par réduction du 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde.....	262
VI.1.4.3. Par méthylation directe de la phloroacétophénone	262
VI.1.5. Réactions de couplage de la méthylphloroacétophénone	262
VI.1.5.1. Réaction de Barton	262
VI.1.5.2. En présence de porphyrine octachlorée métallée au fer	263

VI.2. Cladoxanthone A	265
VI.2.1. Synthèse du 4-chloro-3-méthyl-5-nitrobenzoate de méthyle (6).....	265
VI.2.2. Synthèse du 3-amino-4-chloro-5-méthylbenzoate de méthyle (7)	266
VI.2.2.1. Par réduction du composé nitré en présence de palladium sur charbon	266
VI.2.2.2. Par réduction du composé nitré en présence de chlorure d'étain.....	267
VI.2.3. Synthèse du 4-chloro-3-hydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle (8).....	267
VI.2.4. Synthèse du 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle (9)	269
VI.2.5. Synthèse du 4-chloro-2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle (10)	270

Liste des figures

Figure 1 : Lichens corticoles (à gauche) et lichens saxicoles (à droite).	8
Figure 2 : Taux de croissance annuels reportés dans la littérature pour <i>Rhizocarpon geographicum</i> ...	9
Figure 3 : Principaux types de thalles lichéniques.....	10
Figure 4 : Images en microscopie électronique à transmission d'une structure homéomère (à gauche) et d'une structure hétéromère (à droite) (d'après Aprile <i>et al.</i> , 2011).....	11
Figure 5 : Principaux genres d'algues présents dans les lichens (de gauche à droite) : <i>Trebouxia</i> et <i>Trentepohlia</i> (algues vertes), <i>Nostoc</i> et <i>Scytonema</i> (cyanobactéries).	12
Figure 6 : Isidies de <i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf (à gauche) et sorédies de <i>Imshaugia aleurites</i> S.L.F. Meyer (à droite)	13
Figure 7 : Coupe d'apothécie et photographie des apothécies de <i>Physcia leptalea</i> (à gauche) ; coupe de périthèce et photographie des périthèces de <i>Pyrenula chlorospila</i> (à droite)	14
Figure 8 : Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens (Van Haluwyn <i>et al.</i> , 2009).	15
Figure 9 : Représentation schématisée de la colonisation bactérienne d'un fragment de thalle de <i>Lobaria pulmonaria</i> (adaptée de Grube et Berg, 2009).	15
Figure 10 : Exemples de produits contenant des extraits de lichens.....	18
Figure 11 : Les différentes voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques	20
Figure 12 : Biogenèse des composés issus de la voie de l'acide mévalonique.	21
Figure 13 : Structures de la zéorine (à gauche) et de l'ergostérol (à droite).	21
Figure 14 : Biogenèse, <i>via</i> la voie de l'acide shikimique, de l'acide pulvinique et de la calycine proposée par Mosbach (1964) et Culberson (1969).	22
Figure 15 : Structure de l'acide rhizocarpique.	22
Figure 16 : Formation des précurseurs des polycétides aromatiques.	23
Figure 17 : Acides roccelique (à gauche), rangiformique (au centre) et lichestérinique (à droite).	24
Figure 18 : Structures d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique).	25
Figure 19 : Structures des acides protocétrariques et norstictiques.	25
Figure 20 : Unités orcinol (à gauche) et β -orcinol (à droite) constitutives des depsides et depsidones.	26
Figure 21 : Exemple de depsone, l'acide picrolichénique.	26
Figure 22 : Exemples de diphényléthers lichéniques.	26
Figure 23 : Biogenèse des dibenzofuranes par couplage de deux unités de type acide orsellinique... ..	27
Figure 24 : Structures de l'alectosarmentine et de la strepsiline.....	27
Figure 25 : Structures des dibenzofuranes identifiés chez le lichen <i>Cladonia incrassata</i>	27
Figure 26 : Schéma de biosynthèse de l'acide usnique (adapté de Taguchi <i>et al.</i> , 1966).....	28
Figure 27 : Structures des deux énantiomères de l'acide usnique.	29
Figure 28 : Structures de quelques dérivés de l'acide usnique présents chez les lichens.	30
Figure 29 : Structures de deux dérivés de l'acide usnique : la (-)-mycosounine et de la (-)-cercosporamide.	30
Figure 30 : Schéma de biosynthèse proposé pour les anthraquinones (Stocker-Wörgötter, 2008). ...	31
Figure 31 : Structures de quelques anthraquinones et photographies des lichens dont elles sont issues.	31

Figure 32 : Structures de quelques naphthoquinones et photographies des lichens dont elles sont issues.	32
Figure 33 : Schéma de biosynthèse proposé pour les chromones (Romagni et Dayan, 2002).	32
Figure 34 : Exemples de chromones isolées de lichens.	33
Figure 35 : Structure de base d'une xanthone.	33
Figure 36 : Schéma de biosynthèse des xanthones chez les lichens.	34
Figure 37 : Exemples de trichloronorlichexanthones : l'arthothéline et l'asémone.	35
Figure 38 : Structures de certains dérivés chlorés méthoxylés de norlichexanthone.	36
Figure 39 : Lichexanthone et certains de ses dérivés chlorés.	36
Figure 40 : Structures de l'érythrommone et de la thioméline.	36
Figure 41 : Structures d'une xanthone prénylée glycosylée et de l'hirtusneanoside.	37
Figure 42 : Exemples de phtalides lichéniques.	37
Figure 43 : Révélation des zones d'inhibition dans le cas des bioautographies directe ou "agar overlay".	42
Figure 44 : Exemples de composés lichéniques photoprotecteurs.	44
Figure 45 : Exemples de composés intervenant dans la tolérance des lichens à la pollution.	44
Figure 46 : <i>Cladonia rangiferina</i> et "tapis" de ce lichen en Suède	46
Figure 47 : Structure de l'acide fumarprotocétrarique possédant une activité antiherbivore.	47
Figure 48 : Exemples de structures d'antibiotiques	48
Figure 49 : Exemple d'un test d'activité antimicrobienne par la technique des disques (à gauche) et microplaque 96 puits couramment utilisée pour la technique en milieu liquide (à droite).	50
Figure 50 : Mécanismes d'action de l'acide usnique, en particulier sur les bactéries à Gram positif (<i>S. aureus</i> et <i>B. subtilis</i>), proposés par Maciąg-Dorszyńska <i>et al.</i> (2014).	53
Figure 51 : Produits cosmétiques contenant l'extrait d' <i>U. barbata</i> .	58
Figure 53 : Structure de l'usnéate de sodium (Evosina®).	58
Figure 54 : Produits cosmétiques contenant Evosina®	59
Figure 55 : Structure de l'usnéate de cuivre (Biostat Polvere®).	59
Figure 52 : De gauche à droite : granules homéopathiques de Boiron, compléments alimentaires de Herbamed et d'Eclectic Institute.	60
Figure 56 : Illustration des 17 espèces de lichen récoltées.	66
Figure 57 : Morphologie générale des lichens <i>C. portentosa</i> (à gauche) et <i>C. rangiformis</i> (à droite).	68
Figure 58 : Pourcentages d'extraction obtenus en présence d'acétone, de chloroforme et d'éther diéthylique.	68
Figure 59 : Analyse par CCM des extraits de <i>C. portentosa</i> et <i>C. rangiformis</i> .	69
Figure 60 : Coloration des extraits en solution obtenus avec le chloroforme, l'éther diéthylique et l'acétone.	69
Figure 61 : Schéma des extractions successives sur <i>C. portentosa</i> et <i>F. caperata</i> .	70
Figure 62 : Rendements massiques obtenus pour l'extraction séquentielle par l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'eau chaude (60°C), et pour l'extraction classique par l'acétone.	71
Figure 63 : CCM récapitulatives pour les extraits de <i>F. caperata</i> (à gauche) et <i>C. portentosa</i> (à droite)	71
Figure 64 : Bilan des pourcentages d'extraction obtenus pour les différentes espèces de lichen récoltées.	73
Figure 65 : Analyse comparative par CCM des profils chimiques des extraits	73

Figure 66 : Lieu de récolte de <i>Cladonia incrassata</i> dans la forêt des Vaseix (Verneuil-sur-Vienne, 87).	76
Figure 67 : Aspect général du lichen <i>Cladonia incrassata</i>	76
Figure 68 : Structures des composés identifiés chez <i>C. incrassata</i> , outre l'acide usnique.	77
Figure 69 : Lieu de récolte d' <i>Usnea florida</i> dans la forêt de Saint-Merd-les-Oussines (19).	77
Figure 70 : Aspect général du lichen <i>Usnea florida</i>	78
Figure 71 : Observation à la loupe binoculaire des papilles présentes sur les rameaux d' <i>Usnea florida</i>	78
Figure 72 : Composés décrits chez <i>U. florida</i> et structures de certains d'entre eux.	79
Figure 73 : Lieu de récolte de <i>Flavoparmelia caperata</i> à Soudeilles (19).	80
Figure 74 : Aspect général du lichen <i>Flavoparmelia caperata</i>	80
Figure 75 : Structures de certains composés décrits chez <i>F. caperata</i> .	81
Figure 76 : Schéma d'extraction des lichens. Masses des extraits obtenus (g) et pourcentages d'extraction (%)	82
Figure 77 : Profils chimiques des extraits acétoniques par CCM	83
Figure 78 : Profils phytochimiques des extraits obtenus par analyse CLHP-UVBD (à 230 nm)	85
Figure 79 : Conditions appliquées aux trois extraits pour la méthode adaptée du challenge test.	89
Figure 80 : Activité des extraits sur <i>S. aureus</i> le premier jour (t0) (A) et après 7 jours d'incubation (B)	90
Figure 81 : Activité des extraits sur <i>C. albicans</i> le premier jour (t0) (A) et après 7 jours d'incubation (B)	91
Figure 82 : Activité des extraits sur <i>A. brasiliensis</i> le premier jour (t0) (A) et après 7 jours d'incubation (B)	93
Figure 83 : Graphique de corrélation entre la concentration bactérienne et la quantité d'acide usnique dans les extraits.	94
Figure 84 : Représentations schématisques des structures des parois des bactéries à Gram négatif (à gauche) et des bactéries à Gram positif (à droite).	95
Figure 85 : Structure de la membrane cellulaire fongique (schéma adapté de Abad <i>et al.</i> , 2010).	97
Figure 86 : Pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne obtenus sur <i>S. aureus</i> pour les extraits acétoniques (A) et pour les témoins positifs (Phénopip® à 300 µg/mL et ciprofloxacine à 1 µg/mL) (B)	101
Figure 87 : Technique de bioautographie appliquée aux extraits acétoniques de <i>C. incrassata</i> (CiA), <i>U. florida</i> (UfA) et <i>F. caperata</i> (FcA)	102
Figure 88 : Etapes de purification du composé Ci7 à partir du précipité CiP	105
Figure 89 : Etapes de purification des composés obtenus à partir de l'extrait acétonique de <i>C. incrassata</i> .	106
Figure 90 : Corrélations observées en HMBC pour les protons aromatiques (à gauche) et pour les protons des chaînes latérales (à droite) du composé Ci1.	108
Figure 91 : Corrélations observées en HMBC pour les protons aromatiques (à gauche) et pour les protons des chaînes latérales (à droite) du composé Ci2.	109
Figure 92 : Principales corrélations observées en HMBC et en COSY pour le composé Ci3.	111
Figure 93 : Structure de l'acide thamnolique.	112
Figure 94 : Principales corrélations proton-carbone longue distance observées pour le composé Ci5.	113
Figure 95 : Structure de l'acide squamatique isolé de <i>C. incrassata</i>	113

Figure 96 : Corrélations proton-carbone longue distance observées pour le OH-1.	115
Figure 97 : Corrélations proton-carbone longue distance observées pour les protons H-3 et H-8....	115
Figure 98 : Structure du composé Ci6 et corrélations longue distance proton-carbone observées (HMBC).	116
Figure 99 : Corrélations proton-carbone longue distance observées pour les protons CH ₃ -7.	116
Figure 100 : Corrélations HMBC attendues et observées pour l'hypothèse 1.	117
Figure 101 : Corrélations HMBC attendues et observées pour l'hypothèse 2.	118
Figure 102 : Voie de biosynthèse proposée pour la cladoxanthone A.	118
Figure 103 : Structure de l'acide rhodocladonique proposée par Shibata en 1941 (1), et structure modifiée par Baker et Bullock (1969) et confirmée par Mc Lean <i>et al.</i> (1983) (2).....	119
Figure 104 : Repérage, sur le chromatogramme de l'extrait acétonique (à 230 nm), des composés majoritaires isolés à partir de <i>C. incrassata</i>	120
Figure 105 : Schéma simplifié du fractionnement et composés obtenus pour l'extrait d' <i>U. florida</i> ...	122
Figure 106 : Corrélations longue distance proton-carbone observées en HMBC pour l'acide évernique.	125
Figure 107 : Structure de l'acide physodique isolé d' <i>U. florida</i>	125
Figure 108 : Structure de l'acide 3-hydroxyphysodique isolé d' <i>U. florida</i>	126
Figure 109 : Corrélations observées en HMBC et COSY pour le 5,7-dihydroxy-6-méthylphthalide.	127
Figure 110 : Repérage, sur le chromatogramme de l'extrait acétonique (à 230 nm), des composés majoritaires isolés à partir d' <i>U. florida</i>	128
Figure 111 : Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus pour l'extrait de <i>F. caperata</i> ..	129
Figure 112 : Structure de l'acide protocétrarique isolé de <i>F. caperata</i>	131
Figure 113 : Structure de l'acide capératique isolé de <i>F. caperata</i>	132
Figure 114 : Structure du peroxyde d'ergostérol isolé de <i>F. caperata</i>	133
Figure 115 : Repérage, sur le chromatogramme de l'extrait acétonique (à 230 nm), des composés majoritaires isolés à partir de <i>F. caperata</i>	134
Figure 116 : Bilan des composés isolés à partir des trois espèces de lichen.....	135
Figure 117 : Proportion des composés portant des chaînes aliphatiques parmi les depsidones, depsides et dibenzofuranes (d'après Huneck et Yoshimura, 1996).	136
Figure 118 : Répartition des composés chlorés parmi les grandes classes de métabolites lichéniques	137
Figure 119 : Exemples de dibenzofuranes lichéniques chlorés.....	138
Figure 120 : Technique de bioautographie appliquée aux composés isolés de l'extrait acétonique de <i>C. incrassata</i>	139
Figure 121 : Technique de bioautographie appliquée aux composés isolés de l'extrait acétonique d' <i>U. florida</i>	141
Figure 122 : Technique de bioautographie appliquée aux composés isolés de l'extrait acétonique de <i>F. caperata</i> (à gauche).....	142
Figure 123 : Métabolites isolés en quantité suffisante pour évaluer leurs CMI.	143
Figure 124 : Pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne des acides condidymique, didymique, (-)-usnique et (+)-usnique testés à 1 ; 2,5 ; 5 et 7,5 µg/mL sur <i>Staphylococcus aureus</i>	144
Figure 125 : Pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne des acides protocétrarique, capératique et (+)-usnique testés à 5 ; 7,5 ; 10 et 12,5 µg/mL sur <i>Staphylococcus aureus</i>	145

Figure 126 : Résultats obtenus pour les acides didymique et condidymique par bioautographie et tests en milieu liquide. Hypothèses proposées pour expliquer les différences d'activité sur <i>S. aureus</i>	148
Figure 127 : Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits lichéniques par la méthode adaptée du challenge test et les tests en microplaques.	149
Figure 128 : Modes d'action supposés des acides didymique, condidymique et usnique, sur <i>S. aureus</i>	151
Figure 129 : Réactions de réduction de l'acide usnique.....	156
Figure 130 : Dérivés amines et énamines de l'acide usnique.	157
Figure 131 : Synthèse de l'acide usnique par la méthode de Barton <i>et al.</i> (1956)	158
Figure 132 : Synthèse de l'acide usnique selon la méthode de Hawranik <i>et al</i> (2009).....	159
Figure 133 : Stratégies de synthèse de la méthylphloroacétophénone.	160
Figure 134 : Méthodes d'obtention de la méthylphloroacétophénone par acétylation du phloroglucinol.....	160
Figure 135 : Obtention de la méthylphloroacétophénone selon le protocole de Shah et Shah (1939).	161
Figure 136 : Obtention de la méthylphloroacétophénone selon le protocole de Hawranik <i>et al.</i> (2009).	161
Figure 137 : Synthèse du méthylphloroglucinol à partir du phloroglucinol.....	162
Figure 138 : Obtention de la méthylphloroacétophénone selon le protocole de Nakagawa-Goto et Lee (2006).	163
Figure 139 : Voie de synthèse envisagée pour l'acide usnique.	164
Figure 140 : Stratégies proposées pour la synthèse de la méthylphloroacétophénone.	165
Figure 141 : Formation d'une chromone lors d'une formylation de type de Vilsmeier-Haack (Wang <i>et al.</i> , 2008).....	166
Figure 142 : Formylation du phloroglucinol.	166
Figure 143 : Synthèse du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (1) par formylation du phloroglucinol.	167
Figure 144 : Réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (1) en méthylphloroglucinol (2).	167
Figure 145 : Mécanisme réactionnel proposé pour la réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde en méthylphloroglucinol.	168
Figure 146 : Spectre de masse haute résolution du coproduit formé lors de la réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde en méthylphloroglucinol.	169
Figure 147 : Fragments obtenus et structure supposée du coproduit formé lors de la réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde en méthylphloroglucinol.	169
Figure 148 : Proposition de mécanisme conduisant au coproduit de la réaction de réduction.	170
Figure 149 : Synthèse de la méthylphloroacétophénone (3) par acétylation du méthylphloroglucinol (2).	171
Figure 150 : Composé diacétylé formé au cours de la réaction d'acétylation du méthylphloroglucinol.	171
Figure 151 : Synthèse du 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (4) par formylation de la phloroacétophénone.....	173
Figure 152 : Synthèse de la méthylphloroacétophénone (3) par réduction du 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (4).	174
Figure 153 : Synthèse de la méthylphloroacétophénone (3) par méthylation directe de la phloroacétophénone.....	175

Figure 154 : Structure tridimensionnelle et groupement prosthétique de la peroxydase de raifort (d'après Veitch, 2004).	177
Figure 155 : Structure des porphyrines métallées au fer ou au manganèse utilisées pour le couplage de phénols (Šmejkalová et Piccolo, 2005).	178
Figure 156 : Couplage oxydant de phénols en présence d'une porphyrine métallée au cobalt, d'une base, à chaud et sous pression de dioxygène (Jiang <i>et al.</i> , 2013).	178
Figure 157 : Structure de la tétra(dichloro-phényl)porphyrine utilisée pour le couplage de la méthylphloroacétophénone.	179
Figure 158 : Obtention des bruts R1 et R2 par la réaction de Barton <i>et al.</i> (1956).	180
Figure 159 : Chromatogrammes obtenus, par analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, avant (R1) et après déshydratation (R2).	181
Figure 160 : Chromatogrammes (à 230 nm) des bruts R1 (avant déshydratation) et R2 (après déshydratation) obtenus par analyse CLHP-UVBD (phase inverse).	181
Figure 161 : Modifications structurales envisagées pour la porphyrine octachlorée.	185
Figure 162 : Structure de la cladoxanthone A, isolée du lichen <i>C. incrassata</i>	186
Figure 163 : Synthèse de xanthones selon la méthode de Grover, Shah et Shah (GSS) (1955).	187
Figure 164 : Synthèse d'une xanthone en présence du réactif d'Eaton.	187
Figure 165 : Synthèse des xanthones <i>via</i> des intermédiaires benzophénone et diaryléther (adapté de Mengwasser, 2011).	188
Figure 166 : Synthèse de xanthones par acétylation de Friedel-Crafts en présence de trichlorure d'aluminium.	189
Figure 167 : Synthèse de xanthones par acétylation de Friedel-Crafts en présence d'anhydride trifluoroacétique.	189
Figure 168 : Formation de benzophénones par photo-réarrangement de Fries.	190
Figure 169 : Synthèse de l'euxanthone par Ullmann et Panchaud (1906).	190
Figure 170 : Formation de l'intermédiaire diaryléther par réarrangement de Smiles d'un diarylester.	191
Figure 171 : Possibilités d'obtention de la cladoxanthone A.	192
Figure 172 : Schéma rétrosynthétique de la cladoxanthone A.	193
Figure 173 : Stratégie de synthèse du noyau C à partir du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle.	194
Figure 174 : Formylation du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle.	194
Figure 175 : Composé obtenu par la réaction de Vilsmeier-Haack sur le 4-amino-3-benzoate de méthyle.	195
Figure 176 : Formylation du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle par la méthode de Kiran et Mahadevan (2006).	196
Figure 177 : Schéma rétrosynthétique du noyau C à partir du 4-chloro-3-méthylbenzoate de méthyle.	197
Figure 178 : Nitration du 4-chloro-3-méthyl benzoate de méthyle.	197
Figure 179 : Réduction du 4-chloro-3-méthyl-5-nitrobenzoate de méthyle.	199
Figure 180 : Structure du co-produit obtenu lors de la réduction par le palladium sur charbon en présence de dihydrogène.	200
Figure 181 : Réaction de diazotation-hydroxylation sur le 3-amino-4-chloro-5-méthylbenzoate de méthyle.	202
Figure 182 : Structure du composé étudié par Shinji <i>et al.</i> (2006).	203

Figure 183 : Stratégie S4 : étapes limitantes des deux voies de synthèse envisagées pour le précurseur C.....	204
Figure 184 : Schéma rétrosynthétique du noyau C à partir de l'acide 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoïque.	205
Figure 185 : Estérification de l'acide 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoïque.	205
Figure 186 : Chloration du 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle.....	206
Figure 187 : Chromatogramme de la phase organique obtenu pour l'essai 1 de chloration du 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle (obtenu par CPG-masse) et structures des composés identifiés.	207
Figure 188 : Spectres de masse obtenus en impact électronique pour les composés monochlorés (pics B et C).	207
Figure 189 : Corrélations observées en HMBC permettant l'attribution des structures correspondant aux pics B et C.....	208
Figure 190 : Chromatogrammes obtenus par analyse CPG-SM pour les essais de chloration 4 et 5.	211
Figure 191 : Chromatogramme obtenu par analyse CPG-SM pour l'essai de chloration n°6.	212
Figure 192 : Précurseurs des stratégies de synthèse de la cladoxanthone A.	214
Figure 193 : Extractions séquentielles effectuées sur <i>Cladonia portentosa</i> et <i>Flavoparmelia caperata</i>	234
Figure 194 : Droite étalon obtenue pour le dosage de l'acide usnique.	236
Figure 195 : Droite étalon obtenue pour le dosage de l'acide didymique.....	236
Figure 196 : Mise en place du test par bioautographie.	257

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales classes d'antibiotiques couramment utilisées.	49
Tableau 2 : Composition de quelques cocktails de conservateurs utilisés dans l'industrie cosmétique.	57
Tableau 3 : Bilan des espèces récoltées et de leurs caractéristiques.	67
Tableau 4 : Choix des espèces pour les études phytochimiques : analyse croisée des extraits acétoniques.	75
Tableau 5 : Couleur des extraits acétoniques de <i>C. incrassata</i> , <i>U. florida</i> et <i>F. caperata</i>	82
Tableau 6 : Récapitulatif des composés majoritaires supposés présents dans les extraits acétoniques.	84
Tableau 7 : Caractéristiques des différents signaux majeurs repérés dans les trois extraits acétoniques.	86
Tableau 8 : Pourcentages massiques d'acide usnique dans les extraits acétoniques et dans les lichens.	87
Tableau 9 : Corrélation entre la quantité d'acide usnique dans les extraits et l'activité antimicrobienne.	94
Tableau 10 : Activités antimicrobiennes reportées dans la littérature et pour ce travail pour les extraits de <i>C. incrassata</i> , <i>U. florida</i> et <i>F. caperata</i>	99
Tableau 11 : Corrélation entre la quantité d'acide usnique dans les extraits et l'activité antibactérienne.	101
Tableau 12 : Informations apportées par les différentes techniques mises en œuvre pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits.	104
Tableau 13 : Pourcentages massiques dans l'extrait et le lichen sec obtenus pour l'acide didymique.	110
Tableau 14 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H (400 MHz) et ¹³ C (100 MHz) pour la cladoxanthone A (dans CDCl ₃).	114
Tableau 15 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des composés isolés.....	145
Tableau 16 : Avantages et limites des techniques utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne des composés isolés.....	147
Tableau 17 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H (400 MHz) et ¹³ C (100 MHz) pour le composé diacétylé (dans DMSO-d ₆).	172
Tableau 18 : Rendements obtenus et nombre d'étapes pour les stratégies de synthèse S1, S2 et S3.	176
Tableau 19 : Conditions mises en œuvre pour les premiers essais de couplage de la méthylphloroacétophénone.	182
Tableau 20 : Déplacements chimiques obtenus par analyse RMN ¹ H (400 MHz) et ¹³ C (100 MHz) du composé formé par formylation du 4-amino-3-benzoate de méthyle (dans DMSO-d ₆).	195
Tableau 21 : Données RMN, structure et proportion estimée des trois composés nitrés.	198
Tableau 22 : Données RMN ¹ H du composé aminé attendu.	200
Tableau 23 : Différents protocoles mis en œuvre pour l'étape de diazotation-hydroxylation.	202

Tableau 24 : Conditions opératoires mises en œuvre pour la chloration du 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle dans le DMF en présence de NCS et FeCl ₃	207
Tableau 25 : Données CPG-SM et structures des composés présents dans la phase organique des 3 essais.	208
Tableau 26 : Déplacements chimiques obtenus par analyse RMN ¹ H (400 MHz) et ¹³ C (100 MHz) pour les composés (10) et (10a) (dans CDCl ₃).....	209
Tableau 27 : Essais de chloration en présence de FeCl ₃ dans le dichlorométhane, et en présence de peroxyde d'hydrogène et d'acide chlorhydrique.	210
Tableau 28 : Synonymies des espèces lichéniques étudiées.	232
Tableau 29 : Conditions de l'extraction par l'acétone pour les trois espèces étudiées.	235

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

« Lichens... Vous avez dit lichens ? » Souvent confondus avec les mousses, ils présentent une telle diversité de formes et de couleurs qu'ils éveillent toujours la curiosité du plus grand nombre. Les lichens sont des organismes singuliers résultant de l'association entre un champignon et un ou plusieurs partenaires photosynthétiques. Cette relation symbiotique leur confère notamment l'incroyable aptitude à coloniser des habitats extrêmes, faisant d'eux de véritables pionniers. En effet, si certains sont sensibles à la pollution, d'autres s'avèrent très résistants à des environnements hostiles. Cette résistance est en grande partie liée aux propriétés biologiques de métabolites secondaires originaux, essentiellement produits par le partenaire fongique.

Les civilisations anciennes leurs connaissaient déjà des propriétés remarquables : les égyptiens les utilisaient par exemple pour préserver l'odeur des épices d'embaumement ou encore pour traiter les maux (Elix, 1996). Bien que moins utilisés que les plantes en médecine traditionnelle, ils sont devenus plus récemment des sources potentielles de substances biologiquement actives. Ainsi, de nombreuses espèces font l'objet d'études phytochimiques approfondies afin de mettre à jour des composés nouveaux, qui pourraient trouver des applications dans des domaines tels que l'industrie pharmaceutique ou encore cosmétique.

Depuis quelques années, des agents de conservation classiquement employés dans les produits cosmétiques pour leur action antimicrobienne, les parabènes, sont au cœur d'une vive controverse concernant leurs potentiels effets secondaires (Vo *et al.*, 2010 ; Aubert *et al.*, 2012). Ces composés ont par conséquent connu, et connaissent toujours, une baisse de popularité considérable auprès des consommateurs, ce qui a incité les industriels à développer des produits de soin certifiés « paraben free ». A l'heure actuelle, la recherche de nouveaux conservateurs est donc un enjeu majeur, tant pour les scientifiques que pour les industriels, notamment du domaine cosmétique. De nouvelles stratégies bio-inspirées sont actuellement déployées. Elles affirment la place des molécules naturelles ou d'origines naturelles en tant que composés bioactifs. La diversité végétale est très largement exploitée aujourd'hui et quelques molécules sont actuellement utilisées à une échelle industrielle (Varvaresou *et al.*, 2009). Les lichens sont également une source de composés originaux, et plus particulièrement de métabolites secondaires bioactifs. Parmi eux, l'acide usnique est proposé comme possible alternative aux parabènes. Il possède en effet de nombreuses propriétés biologiques, et notamment une activité antimicrobienne, qui en font un candidat de choix en tant que conservateur.

Avec une faible pollution atmosphérique et un taux de précipitations annuel élevé, le Limousin est une région qui bénéficie de conditions environnementales particulièrement favorables au développement des lichens. Des espèces assez communes appartenant aux genres *Usnea* et *Parmelia* y sont rencontrées, ainsi que des espèces plus rares telles que des *Cladonia*. La présence d'acide usnique est décrite chez plusieurs espèces appartenant à ces trois genres, dont il représente parfois le métabolite secondaire majoritaire. Si ce composé est utilisé dans certains produits de soin, il est néanmoins suspecté d'être potentiellement allergisant (Mitchell et Shibata, 1969) et possède une couleur jaune vive pouvant être un frein à son utilisation. Parmi la grande richesse des composés produits par les lichens, l'identification d'autres métabolites secondaires présentant des propriétés biologiques (dont des activités antibactériennes et antifongiques) constitue un axe de recherche grandissant.

Parmi les 1050 substances lichéniques décrites (Stocker-Wörgötter, 2008), seules quelques-unes sont disponibles commercialement, et le potentiel d'une grande partie d'entre elles reste peu voire pas étudié. En effet, la principale difficulté est d'extraire et d'isoler ces composés en quantité suffisante, avec une pureté convenable, pour en préciser les structures et en évaluer l'activité biologique (Muggia *et al.*, 2009). Enfin, le potentiel allergisant des extraits et composés naturels peut limiter leur utilisation en industrie cosmétique (comme c'est le cas pour l'acide usnique). C'est pourquoi un certain nombre de travaux portent sur la synthèse bio-inspirée de métabolites lichéniques permettant ainsi d'en envisager la valorisation y compris à une échelle industrielle.

C'est dans ce contexte que le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles - *spécialiste de Chimie verte et dont une partie des activités est centrée sur l'extraction, l'analyse structurale et l'évaluation des propriétés biologiques de molécules naturelles* - et la société Sothys International et sa filiale "Les jardins Sothys" - *dont l'activité est associée à la valorisation à usage cosmétique de la flore de l'espace central (Auvergne et Limousin)* - ont décidé d'engager cette étude prospective. Nos efforts de recherche ont porté sur l'étude phytochimique de trois espèces de lichen récoltés en Limousin : *Usnea florida*, *Flavoparmelia caperata* et *Cladonia incrassata*.

La première partie de ce travail décrira les lichens et plus particulièrement leurs métabolites secondaires. Les familles moléculaires identifiées, leurs voies de biosynthèse, les méthodes d'extraction et de purification, ainsi que les propriétés biologiques seront présentées succinctement. La caractérisation des activités biologiques - notamment antimicrobiennes - et l'utilisation de l'acide usnique dans l'industrie cosmétique feront l'objet d'une présentation plus détaillée.

Dans une seconde partie, la sélection d'*Usnea florida*, *Flavoparmelia caperata* et *Cladonia incrassata*, les trois lichens étudiés au cours de la Thèse, sera motivée sur la base des données bibliographiques et d'un criblage de 17 espèces récoltées en Limousin. La caractérisation de l'activité antimicrobienne des extraits acétoniques par une méthode adaptée du challenge test, sur *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*, sera détaillée. Puis, la mise en évidence des composés actifs sur *Staphylococcus aureus* par une technique de bioautographie, suivie du fractionnement bioguidé des extraits seront exposés. Après caractérisation et identification, l'activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* des composés isolés sera déterminée par les techniques de bioautographie et de dilution en milieu liquide. Les activités obtenues seront notamment été comparées à celle du Phénonip®, mélange de parabènes et de phénoxyéthanol classiquement employé en industrie cosmétique.

La troisième partie portera sur l'approche synthétique de deux composés. D'une part, l'optimisation de la préparation du précurseur de l'acide usnique, la méthylphloroacétophénone, sera décrite. Puis, les premiers essais de couplage effectués en présence d'une porphyrine, permettant l'obtention de l'acide hydrousnique intermédiaire, seront reportés. D'autre part, une étude préliminaire sur la synthèse de la cladoxanthone A, composé minoritaire de structure originale isolé au cours de ce travail, sera présentée. Différentes voies de synthèse seront proposées pour conduire à la formation des précurseurs attendus.

La quatrième et dernière partie sera consacrée à la présentation des appareillages, techniques et conditions expérimentales mises en œuvre au cours de ce travail. Une description des composés isolés et synthétisés sera enfin donnée.

C'est en s'appuyant sur ce contexte scientifique et industriel original qu'a débuté cette thèse dont nous souhaitons qu'elle contribue, tant sous l'angle académique que de celui du développement, à éclairer la diversité des métabolites secondaires d'origine lichénique et leur potentiel de valorisation pour l'industrie cosmétique.

PARTIE A

LES LICHENS & LEURS MÉTABOLITES - PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES - VOIES DE BIOSYNTHÈSE



Partie A. Les lichens & leurs métabolites - Propriétés biologiques - Voies de biosynthèse

Les lichens sont des organismes symbiotiques singuliers capables de s'adapter à des conditions environnementales extrêmes. Cette aptitude est possible en particulier grâce à la production de métabolites secondaires originaux qui possèdent pour la plupart des propriétés antimicrobiennes, et pourraient trouver une application en tant que conservateur dans les cosmétiques par exemple. Une attention particulière sera portée à la structure des familles moléculaires présentes dans les lichens. L'acide usnique, composé étudié au cours de ce travail, fera l'objet d'une description plus détaillée, concernant notamment ses propriétés biologiques décrites dans la littérature, et ses utilisations.

I. LES LICHENS

Les lichens, qui sont intégrés dans le règne fongique, résultent de l'association symbiotique d'un champignon appelé mycobionte (du grec *mykes* : champignon ; *bios* : vie) et d'une algue verte et/ou d'une cyanobactérie appelées photobionte (du grec *photo* : lumière ; *bios* : vie). Cette symbiose confère aux lichens une structure et une reproduction spécifiques par rapport à chaque constituant seul. A la différence des plantes supérieures, ils ne possèdent ni racine, ni tige, ni feuille, mais un appareil végétatif rudimentaire : le thalle. La découverte de fossiles suggère qu'ils seraient apparus il y a quelques 600 millions d'années (Yuan *et al.*, 2005).

I.1. Ecologie et répartition

Les lichens sont répandus à travers presque toutes les régions du monde : des zones les plus extrêmes, vers les pôles, jusqu'aux sommets, à la limite des neiges éternelles, dans les déserts rocheux, et représentent environ 8 % de la couverture terrestre (Lange *et al.*, 2001). En France, environ 2500 espèces de lichens ont été répertoriées (Van Haluwyn et Lerond, 1993). Ils colonisent la roche la plus dure, le sol le plus désert et peuvent supporter de très grosses variations de température. Aussi, les lichens sont capables de reviviscence, c'est-à-dire de passer rapidement, réversiblement et répétitivement de l'état sec à l'état hydraté, en particulier en haute montagne (Aubert *et al.*, 2007). Ils tolèrent une dessiccation extrême et une exposition intense aux ultraviolet (UV) en particulier grâce à la présence de pigments corticaux qui piègent ou empêchent la formation de radicaux libres (Nybakken

et al., 2004 ; Gauslaa, 2005 ; Vráblíková *et al.*, 2006). De plus, cette tolérance à la lumière et à la dessiccation est meilleure chez le lichen par rapport aux partenaires isolés (Kranner *et al.*, 2005).

Les lichens sont également adaptés aux basses températures ; l'activité photosynthétique peut être élevée à 0°C et chez certaines espèces à algues vertes, la photosynthèse peut être activée à -20°C grâce à la vapeur d'eau obtenue à partir de la neige. Alors que les algues vertes sont capables d'utiliser la vapeur d'eau, les cyanobactéries ont besoin d'eau liquide. C'est pourquoi les lichens à algues vertes survivent dans des habitats beaucoup plus secs que ceux à cyanobactéries, qui représentent en milieu tropical humide presque la moitié des espèces de lichen connues (Richardson, 2002). Des expérimentations montrent également que les lichens peuvent résister à de hautes températures (90°C), à l'azote liquide (-196°C) (Grube et Berg, 2009), à des conditions réelles dans l'espace (Meeßen *et al.*, 2013) ou proches de celles de la planète Mars (De Vera, 2012).

La plupart des lichens se trouve sur les écorces (corticoles) ou sur la roche (saxicoles) (Figure 1), mais ils se développent aussi sur les bois morts (lignicoles), le sol (terricoles), les mousses, les feuilles persistantes (foliicoles), les débris de végétaux... ou même sur d'autres lichens (lichénicoles).



Figure 1 : Lichens corticoles (à gauche) et lichens saxicoles (à droite).

Certains lichens sont spécifiques des roches calcaires (calcicoles) ou des roches siliceuses (calcifuges) (Van Haluwyn *et al.*, 2009). Les lichens sont sensibles au pH du support, les uns préférant les substrats acides (acidophiles), les autres les substrats basiques (basophiles). D'autres encore sont nitrophiles, préférant des teneurs en azote importantes (nitrates généralement) dont l'origine est souvent humaine (agriculture, urbanisation, industrie, trafic automobile...) mais peut provenir aussi de déjections et cadavres d'animaux, de débris végétaux...

La croissance du thalle est généralement très lente. En moyenne, la croissance annuelle est de 0,5 à 2 mm pour les lichens crustacés, de 0,5 à 4 mm pour les lichens foliacés et de 1,5 à 5 mm pour les lichens fruticuleux, une croissance de 1 cm/an étant considérée comme élevée (Shukla *et al.*, 2010). Par exemple, *Usnea antarctica* (fruticuleux) peut croître de 2 mm/an et *Buellia latermarginata* (crustacé) de 0,5 à 0,87 mm/an (Sancho et Pintado, 2004). Cependant, une même espèce peut présenter des taux de croissance nettement différents en fonction des effets environnementaux (climat, nature du substrat, pollution...) rendant impossible la définition d'une loi de croissance

(Armstrong et Bradwell, 2011). Ainsi, pour *Rhizocarpon geographicum* (crustacé) par exemple, des taux de croissance compris entre 0,2 et 1,4 mm/an sont reportés dans la littérature (Sancho *et al.*, 2007).

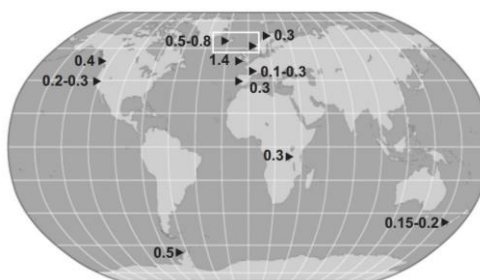


Figure 2 : Taux de croissance annuels reportés dans la littérature pour *Rhizocarpon geographicum*
(exprimés en mm/an) (Sancho *et al.*, 2007).

Aussi, la croissance est favorisée par l'humidité et certains lichens sont sensibles à la pollution atmosphérique. La région Limousin, avec un fort taux d'humidité et une faible pollution, bénéficie de conditions particulièrement favorables au développement des lichens. La région culmine à 977 m d'altitude et se présente comme un étagement de plateaux qui bordent la partie occidentale du Massif Central et s'abaissent doucement vers l'ouest. Les roches sont essentiellement acides : les granites dominant dans les zones de relief, et le gneiss au niveau des plateaux de moyenne altitude. Les précipitations annuelles sont relativement abondantes, de l'ordre de 1100 mm, pouvant atteindre plus de 1600 mm, ce qui est nettement supérieur à la moyenne nationale (800 mm environ) (Botineau et Ghestem, 1995). En termes de pollution atmosphérique, telle que celle due au dioxyde d'azote (NO₂) ou au dioxyde de soufre (SO₂), les concentrations enregistrées pour l'année 2012 sont en moyenne de 15 µg/m³ et 0,5 µg/m³ pour le Limousin (LIMAIR, 2012), contre 45 µg/m³ et 1,5 µg/m³ pour l'Île-de-France (Airparif, 2012), respectivement, et inférieures aux moyennes nationales (NO₂ : 22,5 µg/m³ et SO₂ : 3 µg/m³ d'après le Bilan 2012 de la qualité de l'air en France ; <http://www.developpement-durable.gouv.fr/>).

Ces conditions environnementales privilégiées font du Limousin une région propice au développement des lichens, parmi lesquels des espèces sensibles à la pollution ou en voie de disparition telles que *Lobaria pulmonaria*, *Nephroma parile* et *Usnea filipendula* (Inventaire National du Patrimoine Naturel, 2013).

I.2. Morphologie et anatomie des thalles lichéniques

Le mycobionte joue le rôle le plus déterminant dans la morphologie et la structure du lichen. Le thalle porte les éléments nécessaires à la reproduction et est caractérisé par une grande diversité de formes et de couleurs qui définit 7 principaux types de lichens (Figure 3) (Van Haluwyn *et al.*, 2009) :

- Les **thalles crustacés** sont les plus communs (90 %). Sous forme de croûte, ils adhèrent au substrat dans lequel ils peuvent pénétrer plus ou moins profondément (Figure 3a).
- Les **thalles foliacés** se présentent sous forme de lames ou de feuilles, plus ou moins lobées ou découpées, se détachant facilement du substrat (Figure 3b).
- Les **thalles fruticuleux** sont des thalles en lanières ou tiges plus ou moins ramifiées, dressés ou pendants et adhèrent au substrat par une surface réduite (Figure 3c).

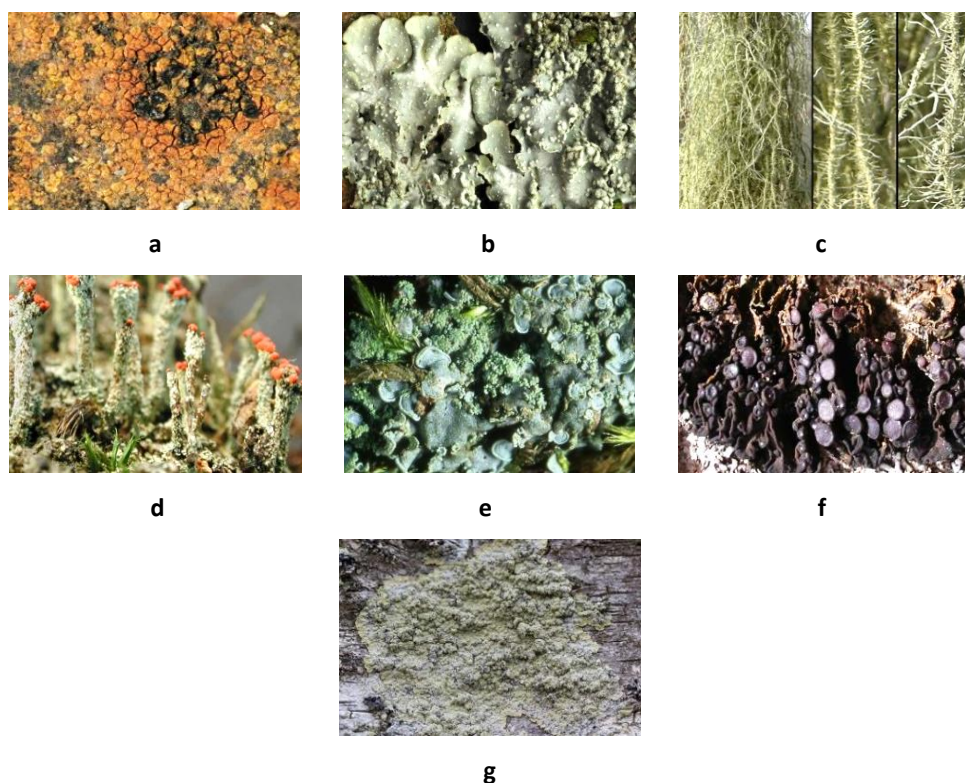


Figure 3 : Principaux types de thalles lichéniques

(source : http://www2.ac-lille.fr/myconord/photos_afl/Photos_AFL_C.htm).

a : *Rhizocarpon oederi* (Web.) Körb. ; b : *Punctelia borrieri* (Sm.) Krog. ; c : *Usnea dasypoga* Stirton ; d : *Cladonia macilenta* Hoffm. ; e : *Normandina pulchella* (Borrer.) Nyl. ; f : *Collema polycarpon* Hoffm. ; g : *Lepraria membranacea* (Dicks.) Vain.

- Les **thalles complexes** ou thalles composites sont formés d'un thalle primaire plus ou moins foliacé et adhérent au substrat, sur lequel se développe un thalle secondaire dressé plus ou moins ramifié ou en forme de trompette (podétion) (Figure 3d).
- Les **thalles squamuleux** se présentent sous forme de petites squamules ou écailles pouvant se chevaucher partiellement (Figure 3e).
- Les **thalles gélatineux** sont noirs et cassants à l'état sec, ont une consistance gélatineuse à l'état humide. Ils peuvent être foliacés, squamuleux, crustacés ou fruticuleux (Figure 3f).
- Les **thalles lépreux** ressemblent à de la poudre se détachant facilement du substrat (Figure 3g).

Bien que la morphologie des lichens soit très variée, leur structure anatomique est très uniforme et assure leur unité. Il existe deux grands types de structures (Figure 4) (Aprile *et al.*, 2011) :

- Structure **homéomère** : les cellules algales sont réparties de façon homogène parmi les hyphes (chez les *Collema* par exemple).
- Structure **hétéromère** stratifiée : de la face supérieure à la face inférieure, les zones suivantes se superposent :
 - Le cortex supérieur formé de cellules jointives de champignon ;
 - La couche algale ou couche assimilatrice, mélange de cellules algales et d'hyphes lâches mycéliens ;
 - La couche médullaire (médulle) formée par des hyphes lâches de champignon ;
 - Le cortex inférieur, cellules de champignon d'où s'échappent parfois des rhizines servant à la fixation du thalle.

Le plus souvent, les hyphes des cortex supérieur et inférieur sont soudées entre elles et constituent de faux tissus cellulux : les paraplectenchymes et prosoplectenchymes.

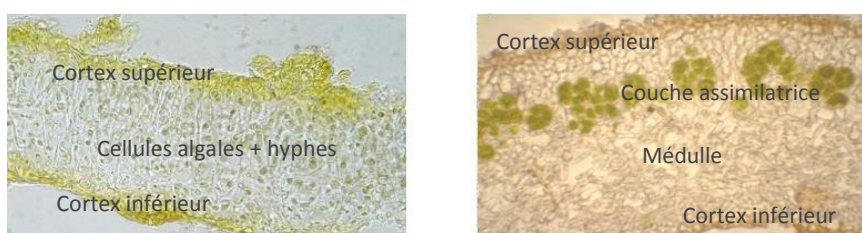


Figure 4 : Images en microscopie électronique à transmission d'une structure homéomère (à gauche) et d'une structure hétéromère (à droite) (d'après Aprile *et al.*, 2011).

Chez certains lichens (stéréocaulons et usnées par exemple), la structure hétéromère est dite radiée car le thalle cylindrique montre une symétrie axiale. De la périphérie au centre, il présente les mêmes couches que celles citées précédemment mais le cortex inférieur est absent et le centre du cylindre est occupé par le cordon axial.

I.3. Constituants des lichens

Au sein du lichen, le champignon joue un rôle important dans la morphologie et assure la reproduction sexuée, par la production de spores. Près de 18 500 espèces de lichens sont décrites (Feuerer et Hawksworth, 2007) et dans 99 % des cas, le mycobionte fait partie des ascomycètes ; le lichen est alors appelé ascolichen. Les spores internes sont formées dans des asques et sont libérées par rupture du sommet de l'asque ou par désintégration de la paroi (Van Haluwyn *et al.*, 2009).

Lorsqu'il s'agit d'un basidiomycète, le lichen est nommé basidiolichen et les spores sont formées à l'extérieur de cellules fertiles appelées basides.

Le photobionte apporte, par le biais de la photosynthèse, la matière organique. Dans 90% des cas, il appartient à la classe des chlorophycées (ou algues vertes), représentées principalement par le genre unicellulaire *Trebouxia* et le genre filamenteux *Trentepohlia* (Figure 5). La plupart possède des cellules à noyau avec un chloroplaste et des grains d'amidon. Les cellules de *Trentepohlia* contiennent des gouttelettes lipidiques de carotène mais pas de grains d'amidon. Les cyanobactéries (anciennement appelées algues bleues) interviennent chez environ 10 % des lichens, les genres *Nostoc* et *Scytonema* étant les plus communs (Figure 5). Les cellules sont dépourvues de noyau, forment des chapelets et ont une coloration bleu vert due à la présence de chlorophylle et de phycocyanine (Van Haluwyn *et al.*, 2009).

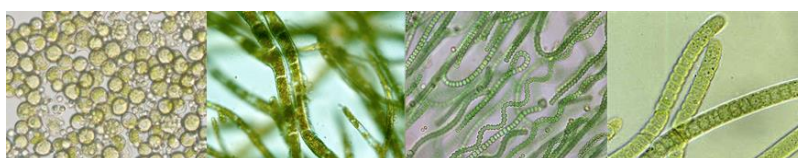


Figure 5 : Principaux genres d'algues présents dans les lichens (de gauche à droite) : *Trebouxia* et *Trentepohlia* (algues vertes), *Nostoc* et *Scytonema* (cyanobactéries).

Enfin, une symbiose tripartite, incluant un champignon ainsi qu'une algue verte et une cyanobactérie, est observée dans 3 à 4 % des cas (Högnabba *et al.*, 2009). Le plus souvent, le thalle des lichens tripartites est constitué d'un champignon et d'une algue verte, tandis que la cyanobactérie est séparée de l'algue et se trouve dans des compartiments fongiques appelés céphalopodies (Lewis et Mc Court, 2004). Selon les conditions environnementales, le mycobionte est capable de changer de partenaire photobionte (de l'algue verte à la cyanobactérie et *vice versa*), ce qui conduit à un changement de morphologie du thalle (photomorphes pour *Lobaria fendleri* par exemple) (Stenroos *et al.*, 2003).

1.4. Reproduction des lichens

Les lichens sont capables de se reproduire selon deux modes : soit par reproduction végétative, soit par reproduction sexuée (rencontre des spores fongiques avec un photobionte). Chez la majorité des lichens, la reproduction sexuée est très largement prédominante ; par exemple, 90 % des lichens de Grande Bretagne et d'Irlande produisent des organes reproducteurs, alors que seuls 29 % se reproduisent par fragmentation (Murtagh *et al.*, 2000).

La reproduction asexuée ou végétative est effectuée par dispersion de fragments de thalles ou d'organes spécialisés comme les isidies ou les sorédies (Figure 6) (Büdel et Scheidegger, 1996) :

- Les **isidies** sont de petites excroissances formées d'algues et de champignons, protégées par le cortex (par exemple, chez *Pseudevernia furfuracea*).
- Les **sorédies** : chez certaines espèces (*Imshaugia aleurites* par exemple), le bord des lanières du thalle est parsemé de tâches farineuses ou soralies. Au niveau de chacune, le cortex du thalle est interrompu et laisse échapper de petits amas, les sorédies, formées d'algues et de filaments mycéliens.

Légères, les isidies et les sorédies sont facilement transportées par le vent, la pluie ou de petits animaux. Une fois fixées sur le substrat adéquat par les hyphes fongiques, elles continuent de croître et se développent.



Figure 6 : Isidies de *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf (à gauche) et sorédies de *Imshaugia aleurites* S.L.F. Meyer (à droite)
(source : http://www2.ac-lille.fr/myconord/photos_afl/Photos_AFL_C.htm).

Etant donné que l'algue se divise uniquement par mitoses, le champignon est le seul à assurer la reproduction sexuée, et forme donc l'organe reproducteur (l'ascome chez les Ascomycètes et le basidiome chez les Basidiomycètes). Les basidiomes sont de petits champignons à lames, semblables à ceux qui ne sont pas lichénisés, tandis que les ascomes se présentent sous forme d'apothécies ou de périthèces (Figure 7).

Les apothécies ont la forme de disques plus ou moins saillants à la surface du thalle. Ils contiennent des asques remplis d'ascospores et régulièrement disposés sur toute la surface centrale. Les périthèces ont une forme de poche enfoncée dans le thalle et s'ouvrent par un pore dans sa partie supérieure.

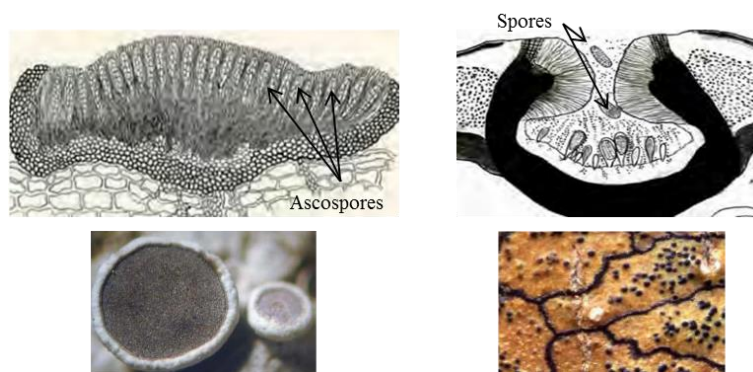


Figure 7 : Coupe d'apothécie et photographie des apothécies de *Physcia leptalea* (à gauche) ; coupe de périthèce et photographie des périthèces de *Pyrenula chlorospila* (à droite)

(source : file:///C:/Users/J206/Downloads/ENS_2011_Lichens_web.pdf).

A maturité, les spores sont projetées sur le substrat, et germent en émettant des filaments mycéliens qui se ramifient rapidement après avoir rencontré des algues libres. Puis, les jeunes thalles se différencient pour devenir des thalles adultes au sein desquels la symbiose s'établit progressivement (Van Haluwyn *et al.*, 2009).

1.5. Echanges nutritionnels entre les partenaires

Au sein du lichen, le mycobionte assure la structure et la protection physique de l'ensemble ainsi que la reproduction sexuée, tandis que le photobionte apporte, *via* la photosynthèse, la matière organique carbonée, ce qui fait du lichen un organisme autotrophe. Le champignon, grâce aux rhizines, a un rôle de fixation sur le substrat. Aussi, il fournit au photobionte l'eau, les sels minéraux et des vitamines telles que la vitamine C. Le mycobionte peut parfois vivre en saprophyte en exploitant les substances organiques du milieu, ou en parasite sur un autre lichen. Les algues vertes produisent de nombreux composés nécessaires au champignon, en particulier de la vitamine B et des polyols, dérivés des sucres. Dans le cas des cyanobactéries, le carbone est cédé au champignon plutôt sous forme de glucose. Elles sont aussi capables de fixer l'azote atmosphérique, fourni au champignon sous forme d'ammonium. Les polyols et le glucose sont ensuite transformés par le champignon en polysaccharides et en métabolites secondaires, appelés substances lichéniques (Figure 8) (Van Haluwyn *et al.*, 2009). L'association symbiotique permet donc la production de composés originaux et spécifiques qui ne pourraient pas être synthétisés par chaque individu seul.

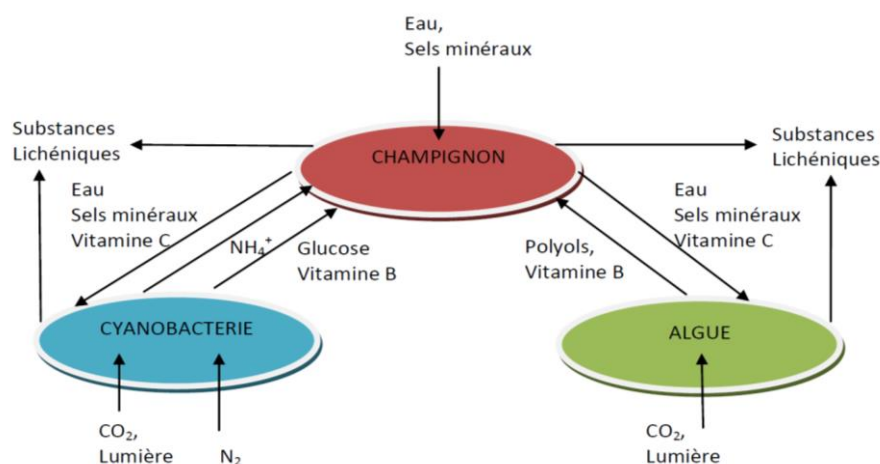


Figure 8 : Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens (Van Haluwyn *et al.*, 2009).

Au-delà des interactions connues entre le mycobionte et le photobionte dans le lichen, des travaux récents ont mis en évidence que les bactéries contribuent à la symbiose par de multiples fonctions (Bates *et al.*, 2011). En effet, les lichens abritent des communautés bactériennes, appelées bactériobiontes, pouvant former des structures de type biofilm sur certaines parties du thalle (Cardinale *et al.*, 2006 ; Kirkelund Hansen *et al.*, 2007) (Figure 9).

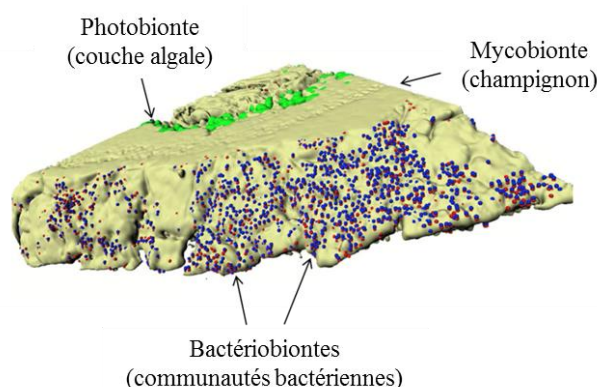


Figure 9 : Représentation schématisque de la colonisation bactérienne d'un fragment de thalle de *Lobaria pulmonaria* (adaptée de Grube et Berg, 2009).

Il a également été mis en évidence que les bactéries sont capables de pénétrer la paroi cellulaire fongique (Cardinale *et al.*, 2008). Certaines bactéries joueraient un rôle dans la nutrition des lichens (Sigurbjörnsdóttir *et al.*, 2014), et les souches bactériennes fixatrices d'azote permettraient d'augmenter la quantité d'azote disponible pour le lichen en libérant des composés azotés, notamment des acides aminés. Cela est particulièrement vrai pour les lichens dont le photobionte n'est pas une cyanobactérie, et qui doivent extraire les composés azotés via le substrat ou des sources extérieures (air, eau, pollution...). Les bactéries associées aux lichens interviennent également dans la

défense contre des agents pathogènes en produisant de puissants antibiotiques actifs à de très faibles concentrations (Davies *et al.*, 2005). Certaines souches bactériennes sont aussi capables de dégrader les parties sénescents du thalle (Grube et Berg, 2009). La matière récupérée peut ainsi être utilisée pour contribuer à la croissance d'autres parties du lichen. Enfin, des études révèlent que certaines bactéries produisent des hormones. La production d'acide indole acétique (Liba *et al.*, 2006), d'éthylène et d'autres composés altérerait le processus de morphogenèse et aurait un effet sur la croissance des deux partenaires symbiotiques.

Outre les bactéries, de nombreuses espèces de champignons peuvent vivre en étroite association avec le lichen. Il peut s'agir de champignons endolichéniques (associés au photobionte, au sein du thalle) (U'Ren *et al.*, 2012), capables de produire des métabolites d'intérêt (Ding *et al.*, 2009 ; Kannangara *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2013), ou encore de champignons épilichéniques (lichénicoles, en surface du thalle) (Lawrey et Diederich, 2003), dont certains produiraient des enzymes dégradant les métabolites secondaires lichéniques pour permettre leur colonisation (Lawrey *et al.*, 1999).

I.6. Utilisations des lichens

I.6.1. Propriétés médicinales et pharmacologiques

Les lichens ont été consommés en temps de famine, par exemple lors du siège de Leningrad (1941-1944) (Karagöz *et al.*, 2009), et ils sont utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle, soit dans leur intégralité, soit sous forme d'extraits. Les indiens d'Amérique, les égyptiens, les indiens et les chinois employaient les lichens pour traiter les maux, et en premier lieu comme expectorants (Elix, 1996). Le lichen *Peltigera canina*, un lichen foliacé à cyanobactérie et riche en méthionine, était utilisé en Inde comme remède contre les maux hépatiques. Dans différentes pharmacopées, de nombreuses espèces de lichens possédant une activité thérapeutique sont recensées telles que *Cetraria islandica*, *Cladonia coccifera*, *Usnea plicata*, *Peltigera canina*, *Lobaria pulmonaria*, *Xanthoria parietina* et *Evernia prunastri* (Saklani et Upreti, 1992). En Espagne, certaines espèces de lichens étaient utilisées comme diurétiques (*Ramalina bourgeana*), analgésiques (*Xanthoria parietina*), pour traiter les douleurs menstruelles, les problèmes rénaux, ou encore respiratoires (*Pseudevernia furfuracea*) (González-Tejero *et al.*, 1995). En Inde, des mélanges d'au moins deux espèces de *Parmelia*, *Usnea longissima*, *Ramalina subcomplanata* et *Heterodermia tremulans* sont vendus sous le nom de « Chharila » et sont utilisés comme astringent, laxatif et carminatif (Shukla *et al.*, 2010).

Le lichen *Cetraria islandica*, ou « mousse d'Islande », trouve de nombreuses applications médicales. Il a été longtemps utilisé contre la tuberculose, les bronchites chroniques, les diarrhées et permet également de traiter les inflammations de la gorge et de la cavité buccale, les maladies

d'estomac, gastriques ou encore la grippe. Des études en Islande et en Allemagne ont conduit au développement de capsules et de tablettes à base d'extraits de ce lichen, utilisées en cas d'obstruction intestinale, d'ulcère gastrique, d'arthrite et d'asthme (Podterob, 2008).

I.6.2. Bioindicateurs de pollution

Une des utilisations très répandue des lichens est leur capacité à « révéler les pollutions ». En effet, ils sont de véritables sentinelles de l'environnement car ils développent rapidement des réactions physiologiques et cellulaires en relation avec les stress environnementaux. Contrairement aux plantes, ils n'ont ni cuticule protectrice, ni stomate, ce qui augmente les échanges des lichens avec l'air ambiant (Häffner *et al.*, 2001). Les espèces de lichens sensibles à la pollution sont utilisées comme bioindicateurs (Gombert *et al.*, 2006 ; Thormann, 2006), leur présence ou leur disparition étant un signe de bonne ou de mauvaise qualité de l'air, des sols ou des rivières. Les lichens dont le photobionte est une cyanobactérie (du genre *Nostoc* par exemple) ou une algue verte du genre *Coccomyxa* sont connus pour être plus sensibles aux métaux que ceux dont le photobionte est une algue verte du genre *Trebouxia* (Guschina et Hardwood, 2006).

Les lichens les plus résistants sont capables d'accumuler les polluants ; ce sont des bioaccumulateurs. Cette capacité accumulatrice des lichens est utilisée en diagnostic et concerne en particulier le dioxyde de soufre, le fluor, les éléments-traces métalliques, les radioéléments et les polluants organiques (Van Haluwyn, 1999 ; Purvis, 2014). Des travaux réalisés sur le lichen *Diploschistes muscorum*, hyperaccumulateur de zinc, mettent en évidence la formation de complexes stables de ce métal avec l'acide oxalique ainsi qu'avec les substances lichéniques (Cuny *et al.*, 1997). Ce phénomène de complexation a également été observé pour le plomb, le cuivre et le cadmium (Chatenet et Botineau, 2001). Une autre étude réalisée sur *Trapelia involuta* montre que ce lichen est capable de piéger l'uranium dans les parties externes de ses fructifications (Mc Lean *et al.*, 1998).

I.6.3. Autres applications

Dans l'Egypte ancienne, les lichens étaient utilisés également comme parfums ou pigments. Aussi, les romains teignaient leurs toges avec des lichens tels que *Rocella*, *Parmelia*, *Ochrolechia* et *Evernia* sp. L'origine d'une industrie concernant l'utilisation des lichens à des fins tinctoriales remonte au début du XIV^{ème} siècle. L'orseille, une substance colorante de couleur violette extraite de certains lichens (de *Rocella fuciformis* notamment), a été utilisée jusque vers la fin du XIX^{ème} siècle. Aujourd'hui encore, des bandelettes de papier imprégnées de litmus, un colorant extrait par l'eau à partir de *Rocella* sp., sont utilisées comme indicateurs de pH en laboratoire (Mitrovic *et al.*, 2011).

A l'heure actuelle, les extraits des lichens *Evernia prunastri* (ou « mousse de chêne ») et *Pseudevernia furfuracea* (ou « mousse d'arbre ») sont largement utilisés en parfumerie (Joulain et Tabacchi, 2009), pour leur note marine et boisée respective, en particulier dans les eaux de toilette masculines. Cependant, la présence dans ces extraits de composés allergènes, notamment l'atranorine, impose aux fabricants le respect de la directive européenne 2003/15/CE qui oblige à faire figurer clairement la présence de tels extraits dans la liste des ingrédients, lorsque la concentration est supérieure à 0,001 % dans les produits non rincés (crèmes...) et à 0,01 % dans les produits rincés (shampooings...).

Outre les parfums, certains extraits lichéniques trouvent des utilisations dans des produits de soin, tels que des déodorants, ou les produits cosmétiques. Par exemple, les marques Polaar et Vertumne à Vénus proposent des gammes de produits à base d'extrait de *Cetraria islandica* pour lequel elles revendiquent des propriétés hydratantes, purifiantes, déodorantes, antiseptiques et antioxydantes (Figure 10).



Figure 10 : Exemples de produits contenant des extraits de lichens (de gauche à droite) : parfum masculin d'Hermès, déodorant d'Earth Science, gel cryo-raffermissant de Polaar et lotion hydratante pour les mains de Vertumne à Vénus.

Les lichens trouvent donc des applications en médecine traditionnelle, en teinturerie et en parfumerie ainsi qu'en cosmétique. Les propriétés variées exprimées par ces organismes symbiotiques sont essentiellement liées à leur capacité à produire des métabolites secondaires. En effet, ces derniers possèdent des activités biologiques diverses très utiles au sein du lichen, mais pourraient être valorisés à des fins thérapeutiques ou cosmétiques.

II. LES METABOLITES SECONDAIRES LICHENIQUES

Les lichens produisent une large variété de composés organiques divisés en deux groupes principaux : les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

Les métabolites primaires regroupent les protéines, les lipides, les polyols, les polysaccharides, les pigments (chlorophylles, xanthophylles, carotènes...) et autres composés organiques intervenant dans le métabolisme et la structure des lichens (Podterob, 2008 ; Mitrovic *et al.*, 2011) ; ils sont produits par le champignon et le photobionte (algue verte ou cyanobactérie). Ils ne sont pas spécifiques aux lichens et sont également retrouvés chez les champignons, les algues et plantes supérieures. Les polysaccharides, en particulier, ont fait l'objet d'études démontrant leurs activités biologiques, notamment antitumorale, immunostimulante et antivirale (Olafsdottir et Ingólfssdóttir, 2001 ; Omarsdottir *et al.*, 2007). Ils sont produits en grande quantité dans les lichens et sont principalement des α - ou β -glucanes linéaires ou peu substitués, des galactomannanes, des galactoglucomannanes, et des hétéroglycanes complexes (Stocker-Wörgötter *et al.*, 2013).

Les métabolites secondaires sont des substances originales divisées en plusieurs familles et sont principalement responsables de l'aptitude des lichens à se développer dans des conditions extrêmes. Ils représentent en moyenne 5 à 10 % de la masse sèche du thalle (jusqu'à 20 %) (Shukla *et al.*, 2010) et sont généralement excrétés des cellules fongiques pour former des cristaux à la surface du thalle. Ils peuvent également être accumulés au niveau de la médulle, du cortex supérieur ou d'organes spécialisés tels que les fructifications (Oksanen, 2006). Ils sont essentiellement produits par le mycobionte, mais la majeure partie provient exclusivement de l'action synergique des deux partenaires dans le lichen (Müller, 2001).

Asahina et Shibata ont été les premiers à proposer la classification des métabolites secondaires lichéniques sur la base des voies de biosynthèse (Asahina et Shibata, 1971), décrites par la suite dans la littérature (Culberson et Elix, 1989).

II.1. Voies de biogenèse des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires lichéniques peuvent être obtenus *via* trois voies de biogenèse proposées dans la littérature : la majorité de ces composés est dérivée de la voie de l'acétate polymalonate ou polycétide synthase ; les autres métabolites secondaires sont issus des voies de l'acide shikimique et de l'acide mévalonique (Stocker-Wörgötter *et al.*, 2013). La Figure 11 récapitule ces différentes voies de biosynthèse décrites dans la littérature pour les composés secondaires lichéniques.

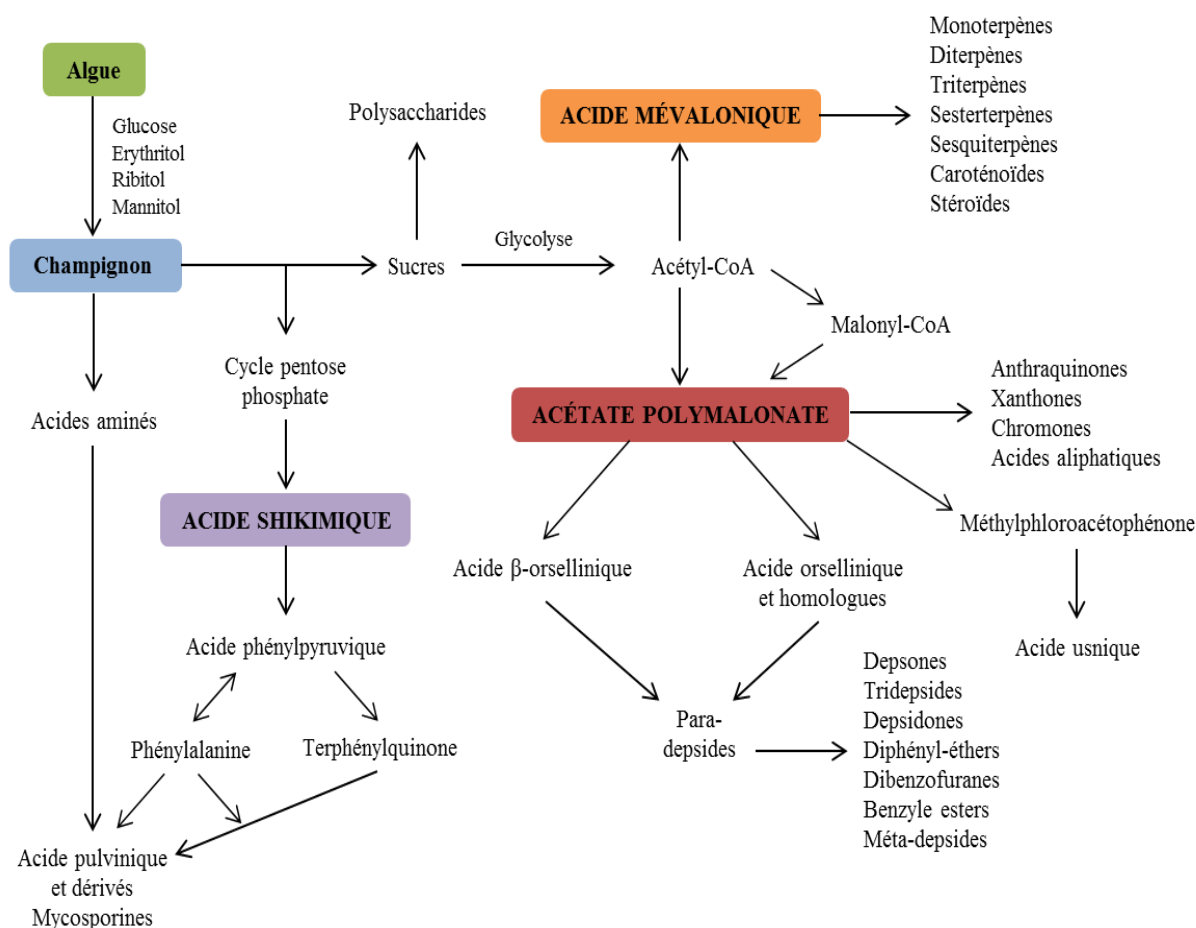


Figure 11 : Les différentes voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques

(adapté de Elix, 1996 et Huneck, 1999).

II.1.1. Voie de l'acide mévalonique

La voie de l'acide mévalonique conduit essentiellement à la synthèse de mono-, di-, tri-, sester- et sesquiterpènes, stéroïdes et caroténoïdes (Huneck, 1999). Pour la plupart, ils ne sont pas spécifiques des lichens et sont issus de l'assemblage d'unités isopréniques formées à partir de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA).

L'isopentenylpyrophosphate (unité en C5), obtenu à partir de l'acide mévalonique, conduit soit au géranylgeranylpyrophosphate (unité en C20), précurseur des diterpènes et des caroténoïdes, soit aux sesterterpènes (unités en C25), soit au squalène (unité en C30), précurseur des stéroïdes et des triterpènes (Figure 12).

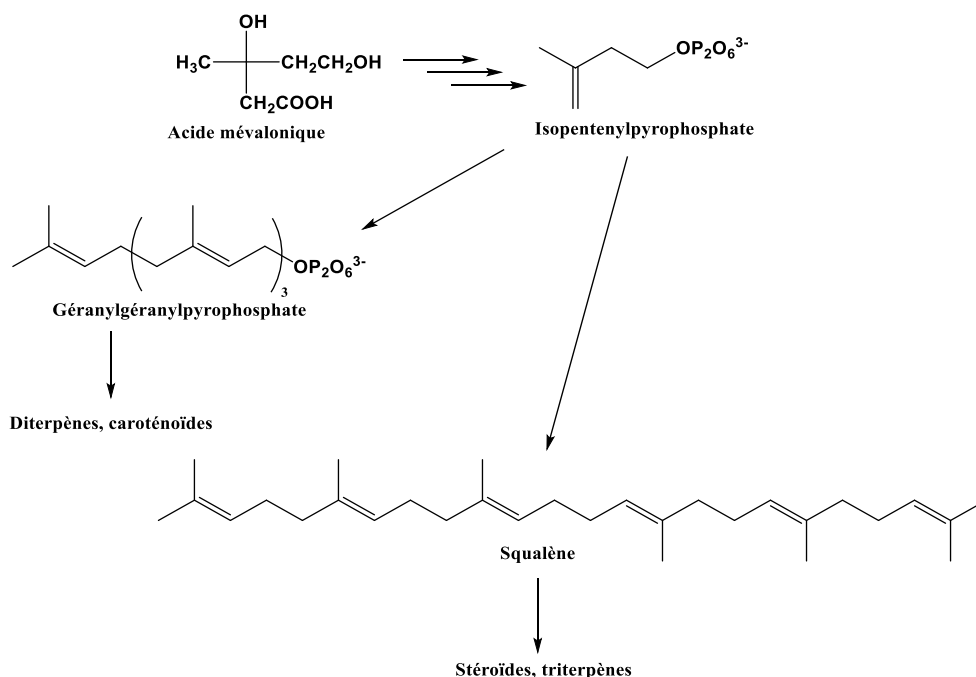


Figure 12 : Biogenèse des composés issus de la voie de l'acide mévalonique.

Très peu de diterpènes et de sesterterpènes lichéniques ont été isolés à ce jour. Les triterpènes sont plus communs chez les lichens avec de nombreux composés décrits tels que la zéorine et ses dérivés. Parmi les stéroïdes et caroténoïdes présents chez les lichens, l'ergostérol et la zéaxanthine respectivement peuvent être cités (Figure 13) (Romagni et Dayan, 2002).

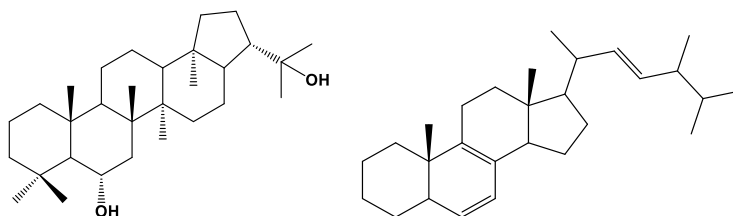


Figure 13 : Structures de la zéorine (à gauche) et de l'ergostérol (à droite).

II.1.2. Voie de l'acide shikimique

Cette voie permet la synthèse d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) qui, chez les plantes, sont les précurseurs des flavonoïdes, des coumarines, ou encore des alcaloïdes. En revanche, chez les lichens, des composés atypiques, tels que l'acide vulpinique et la calycine, sont formés respectivement chez *Lethraria vulpina* et *Pseudocyphellaria crocata* (Stocker-Wörgötter, 2008) (Figure 14). La phénylalanine serait le précurseur, via la formation d'acide polyporique, de l'acide pulvinique dilactone, lui-même à l'origine de la calycine.

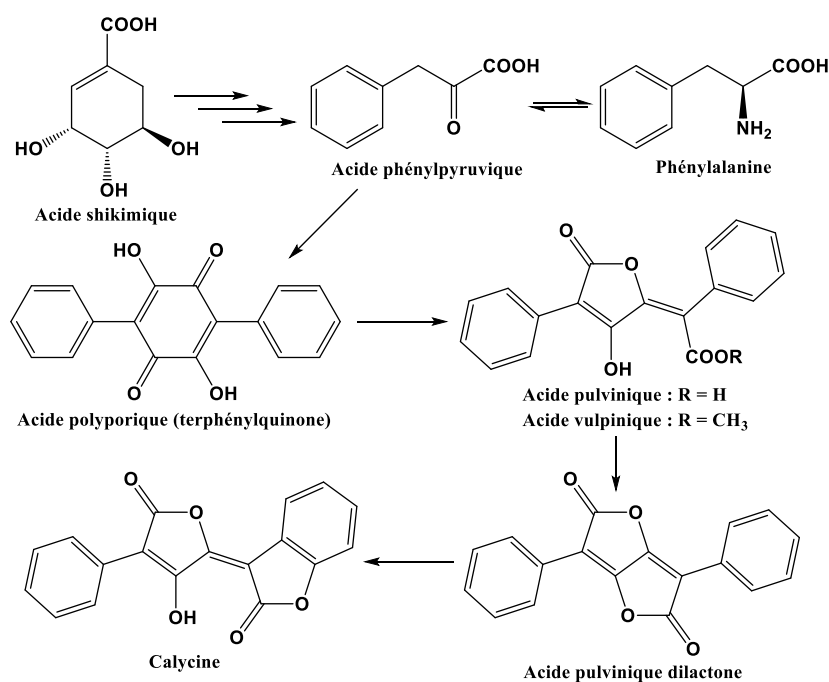


Figure 14 : Biogénèse, *via* la voie de l'acide shikimique, de l'acide pulvinique et de la calycine proposée par Mosbach (1964) et Culberson (1969).

Un autre composé bien connu issu de la voie de l'acide shikimique est l'acide rhizocarpique, produit par certaines espèces du genre *Rhizocarpon* (Figure 15). La calycine et l'acide rhizocarpique sont des pigments verts jaunâtres photoprotecteurs, capables d'absorber les radiations UVA et UVB.

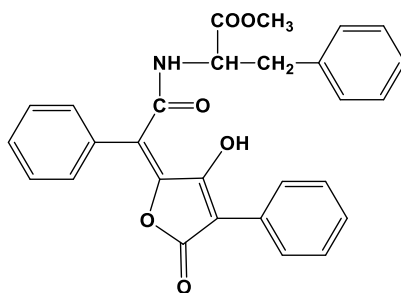


Figure 15 : Structure de l'acide rhizocarpique.

II.1.3. Voie de l'acétate polymalonate

La voie de l'acétate polymalonate conduit à la synthèse des depsides, depsidones, depsones, dibenzofuranes, anthraquinones, xanthones, chromones, acides aliphatiques et dérivés de l'acide orsellinique. Cette voie de biosynthèse permet l'obtention de métabolites originaux parmi lesquels :

- Les polyacétates aromatiques représentent la majorité des métabolites secondaires présents chez les lichens. La synthèse de ces polycétides au sein du champignon serait contrôlée par

des complexes enzymatiques multifonctionnels appelés polycétides synthases (Eisenreich *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2012). Aussi, la diversité des substituants observée sur les squelettes de base serait due à l'action d'enzymes telles que des hydrolases et des cyclases lors d'étapes post-biosynthétiques (Stocker-Wörgötter, 2008). La première étape consiste en l'addition de trois unités de malonyl-CoA à une unité d'acétyl-CoA pour former un tétracétide linéaire (en C8). Cette structure peut ensuite se cycliser par condensation de type aldolisation interne ou condensation de Claisen, pour conduire à différents précurseurs : l'acide orsellinique et ses homologues, ainsi que la phloroacétophénone (Romagni, 2009). Ces composés sont les structures de base des polyacétates aromatiques et se condensent pour former des molécules di-, tri- ou tétracycliques (depsides, depsidones, depsones, dibenzofuranes, acide usnique) (Figure 16).

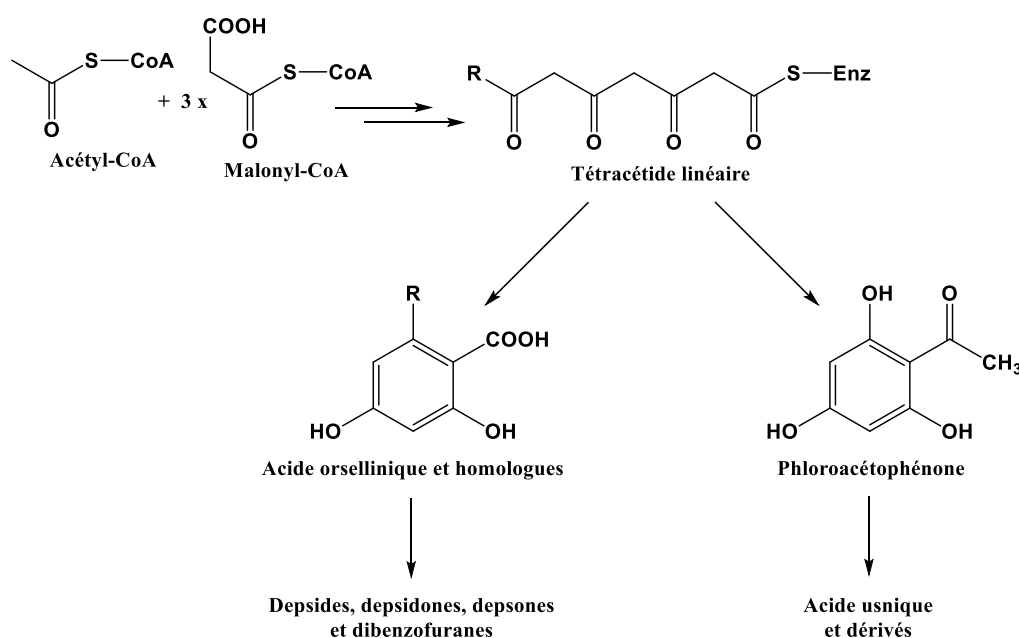


Figure 16 : Formation des précurseurs des polycétides aromatiques.

Les dérivés de l'acide orsellinique sont rarement retrouvés dans les lichens car le plus souvent, les métabolites extraits sont les produits finaux de la voie de biosynthèse, par exemple les depsides et depsidones. S'ils sont isolés, ces dérivés sont généralement des artefacts issus de l'hydrolyse partielle des depsides durant l'extraction et les étapes de purification (Stocker-Wörgötter, 2008).

Enfin, la cyclisation directe de polycétides linéaires (octacétides) conduit à la formation des anthraquinones, chromones et xanthones.

- Les acides aliphatiques, dont la formation résulte de la condensation de type aldolisation d'une longue chaîne alcanoyl-SCoA avec une unité d'acide cétonique. Ces acides lichéniques

peuvent être divisés en trois groupes : les diacides gras (acide roccelique), les triacides gras (acide rangiformique) et les γ -lactones (acide lichestérinique) (Figure 17).

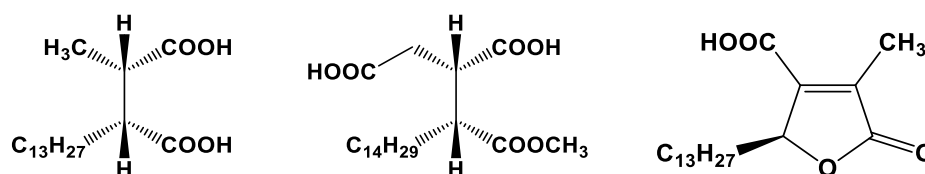


Figure 17 : Acides roccelique (à gauche), rangiformique (au centre) et lichestérinique (à droite).

II.2. Principales familles de polycétides aromatiques

La plupart des composés polyaromatiques sont formés par couplage de deux ou trois unités phénoliques dont le mode d'assemblage conduit à différents types de structures. Un couplage de type estérification aboutit aux depsides tandis qu'un couplage de type éthérification conduit aux diphényléthers. A partir des depsides, une réaction secondaire d'éthérification permet d'obtenir des depsidones. Un couplage oxydant correspondant à la jonction de deux cycles par liaison carbone-carbone conduit à la formation des depsones (à partir des depsides), dibenzoquinones et dibenzofuranes.

II.2.1. Les depsides, depsidones, depsones et diphényléthers

II.2.1.1. Les depsides

Parmi les depsides, les didepsides (atranorine par exemple) et les tridepsides (acide lasallique par exemple) sont issus du couplage entre deux ou trois unités d'acide orsellinique par estérification du groupement carboxylique d'une molécule avec le groupement hydroxyle d'une seconde molécule (Figure 18). Cet hydroxyle peut être en *para* ou en *meta* du deuxième noyau d'où la nomenclature de *para*- et *meta*-depsides.

Les depsides ne sont pas spécifiques aux lichens et sont également retrouvés dans certaines plantes de la famille des Lamiacées, des Papavéracées ou des Géraniacées. Plus rarement, des tétradepsides, tels que l'aphthosine isolée du lichen *Peltigera aphthosa* (Bachelor et King, 1970), ont été décrits.

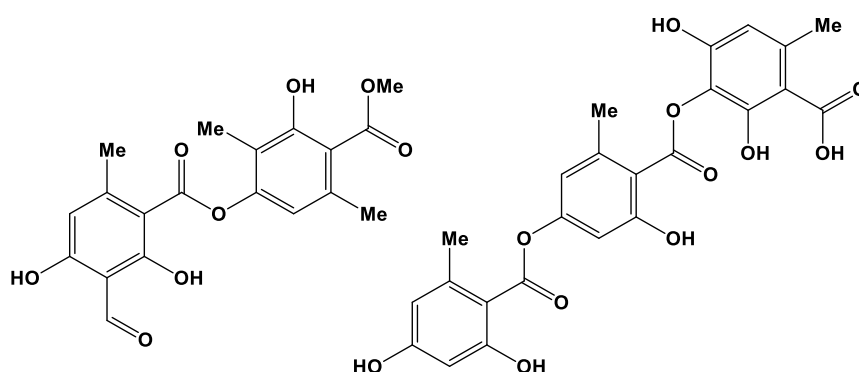


Figure 18 : Structures d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique).

II.2.1.2. Les depsidones

Les depsidones, telles que les acides protocétrarique et norstictique, sont issues du couplage oxydant intramoléculaire de depsides (Figure 19). Différentes études s'attachant à élucider la voie de biosynthèse *in vivo* des depsidones ont démontré que celle-ci inclut des réarrangements moléculaires, de type réarrangements de Smiles, en passant par la formation d'un depside intermédiaire puis d'un diphenyléther (Culberson et Elix, 1989). L'hypothèse la plus récente décrite dans la littérature implique une oxydation du noyau depside par une dioxygénase suivie d'une cyclisation de l'intermédiaire dihydroxydihydro-benzène formé (Stojanović *et al.*, 2012).

Des depsidones ont également été retrouvées dans des champignons tels que *Botryosphaeria rhodina* (Abdou *et al.*, 2010) et *Corynespora cassiicola* (Chomcheon *et al.*, 2009), ainsi que sporadiquement dans des plantes supérieures du genre *Garcinia* (Ngoupayo *et al.*, 2008).

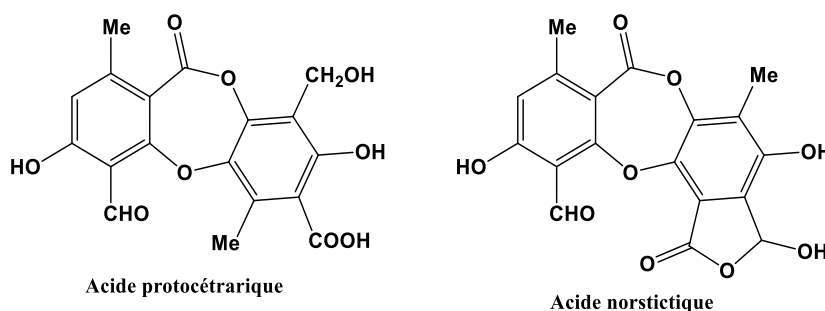


Figure 19 : Structures des acides protocétrarique et norstictique.

Il existe deux catégories de depsides et depsidones, certains de ces composés étant constitués d'unités de type orcinol, et d'autres d'unités de type β -orcinol, se différenciant par la présence d'un carbone en position 3 du cycle aromatique (Figure 20). Les depsides et depsidones sont donc classés comme appartenant à la série des orcinol ou des β -orcinol. Une étude récente a montré que ces

composés sont biosynthétisés par des complexes distincts : des orcinol polycétides synthases et des β -orcinol polycétides synthases (Armaleo *et al.*, 2011).

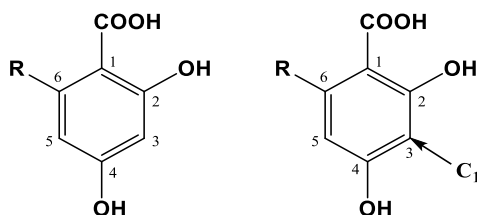


Figure 20 : Unités orcinol (à gauche) et β -orcinol (à droite) constitutives des depsides et depsidones.

II.2.1.3. Les depsones et diphényléthers

Les depsones (acide picrolichénique par exemple, Figure 21) sont des composés lichéniques rares et sont issues elles aussi des depsides par oxydation intramoléculaire conduisant à un couplage carbone-carbone (Romagni et Dayan, 2002).

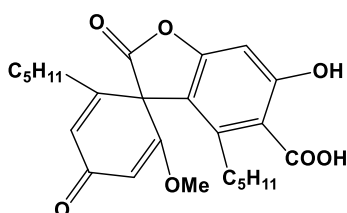


Figure 21 : Exemple de depstone, l'acide picrolichénique.

Les diphényléthers (acide micaréique et buelline par exemple, Figure 22) dérivent d'un couplage de type étherification et constituent un groupe relativement rare parmi les composés lichéniques (Elix *et al.*, 1984). Leur co-occurrence avec les depsidones au sein d'un même lichen suggère une relation biosynthétique entre ces composés. Ainsi, la buelline isolée du lichen *Diploicia canescens* dériverait d'une depsidone (la diploïcine) et serait un intermédiaire vers la formation d'un autre diphényléther : le buellolide (Milot *et al.*, 2009).

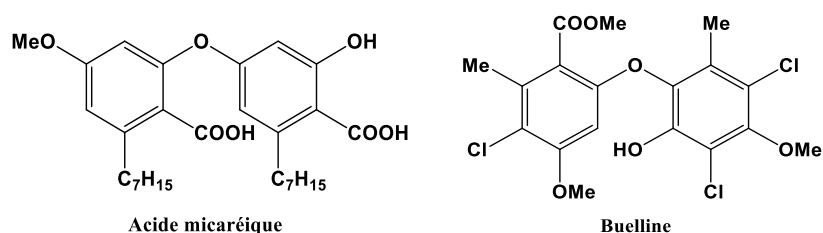


Figure 22 : Exemples de diphényléthers lichéniques.

II.2.2. Les dibenzofuranes et l'acide usnique

Les dibenzofuranes sont issus du couplage oxydant entre deux unités de type acide orsellinique (Figure 23). Une cyclisation entre un groupement acide carboxylique et un groupement hydroxyle est possible et peut conduire à la formation d'un noyau lactone ; c'est le cas par exemple de l'alectosarmentine (Gollapudi *et al.*, 1994) et de la strepsiline (Gonzalez *et al.*, 1992) (Figure 24).

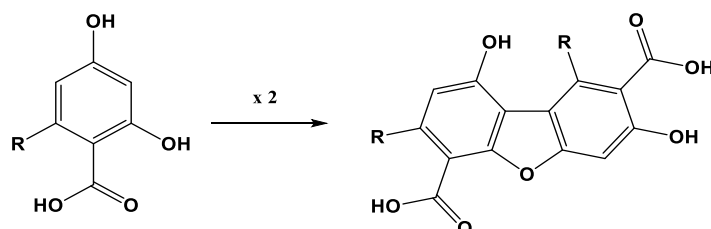


Figure 23 : Biogenèse des dibenzofuranes par couplage de deux unités de type acide orsellinique.

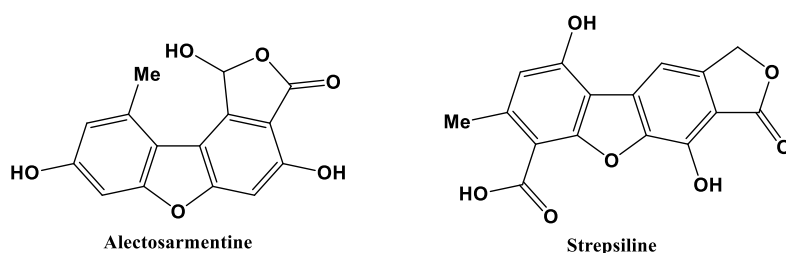


Figure 24 : Structures de l'alectosarmentine et de la strepsiline.

Les dibenzofuranes sont peu communs dans la nature et sont retrouvés presque exclusivement chez certaines espèces de lichens des genres *Stereocaulon*, *Cladonia*, *Lepraria*, *Haematomma* ou *Lecidea*. Par exemple, les acides didymique et condidymique ont été isolés des lichens *Cladonia rangiferina* (Yoshikawa *et al.*, 2008) ; ces mêmes composés ont également été identifiés avec l'acide subdidymique chez *Cladonia incrassata* (Huovinen *et al.*, 1989). Ces trois molécules ont la particularité d'être substituées par des chaînes latérales à trois et cinq atomes de carbone (Figure 25).

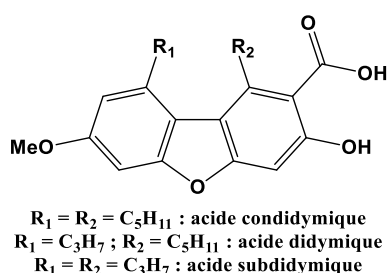


Figure 25 : Structures des dibenzofuranes identifiés chez le lichen *Cladonia incrassata*.

Les lichens biosynthétisent également quelques dérivés apparentés aux dibenzofuranes tels que des dihydro-dibenzofuranes (acides usnique et isousnique) et des tétrahydro-dibenzofuranes (acides placodiolique et pseudoplacodiolique).

L'acide usnique est sans aucun doute le métabolite lichénique le plus commun et le plus étudié. Contrairement aux dibenzofuranes, il est issu du couplage oxydatif entre deux molécules de méthylphloroacétophénone. La voie de biosynthèse proposée, sous contrôle enzymatique, implique la méthylation du tétracétide avant cyclisation pour former la méthylphloroacétophénone, suivie d'un mécanisme radicalaire conduisant à la cyclisation et la formation de l'acide hydro-usnique. Enfin, une étape finale de déshydratation permettrait l'obtention d'acide usnique (Taguchi *et al.*, 1966) (Figure 26).

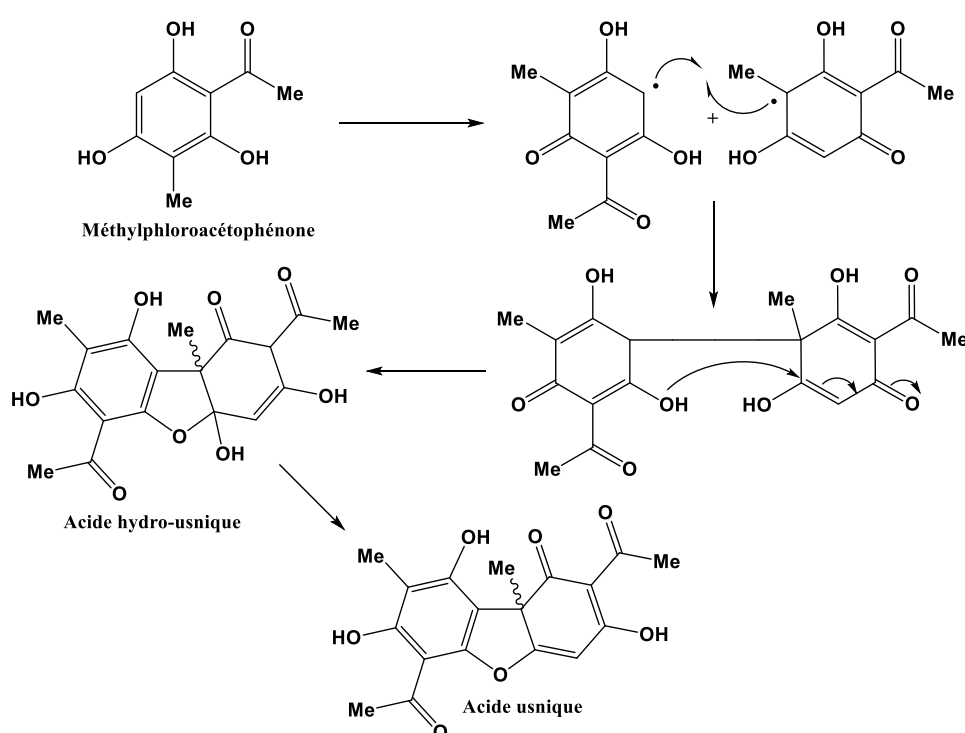


Figure 26 : Schéma de biosynthèse de l'acide usnique (adapté de Taguchi *et al.*, 1966).

L'acide usnique est un pigment cortical jaune qui existe sous deux formes énantiomériques, acide (+)-usnique et acide (-)-usnique, selon l'orientation du groupement méthyle porté par le carbone asymétrique (en position 9b). La configuration absolue R de l'acide (+)-usnique a été déterminée par diffraction des rayons X (Huneck *et al.*, 1981) (Figure 27). L'acide usnique est présent chez de nombreuses espèces de lichen et peut représenter de 1 % à 9 % de la masse sèche du lichen (Bjerke *et al.*, 2004). La présence de plus de 6 % d'acide (-)-usnique dans le lichen *Alectoria ochroleuca* a été mise en évidence (Proska *et al.*, 1996). L'acide (+)-usnique est le plus commun et se retrouve dans certaines

espèces des genres *Usnea* et *Parmelia*, tandis que l'acide (-)-usnique a été décrit chez certaines espèces de *Cladonia* (Cetin *et al.*, 2008).

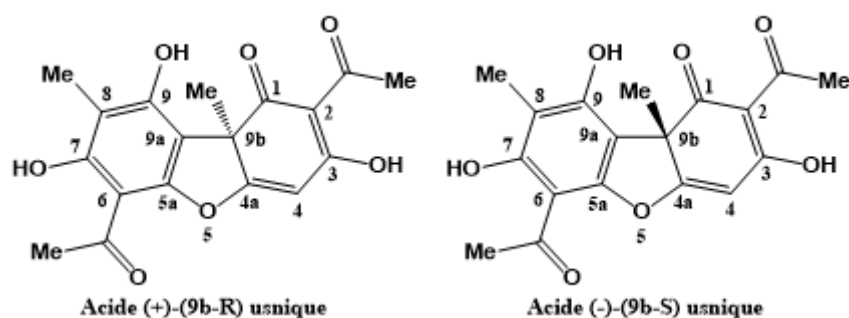


Figure 27 : Structures des deux énantiomères de l'acide usnique.

Au sein du lichen, les plus grandes concentrations en acide usnique sont retrouvées principalement dans les zones les plus jeunes du thalle (Quilhot *et al.*, 1987 ; Hyvärinen *et al.*, 2002). Cette variabilité de concentration dans le thalle est généralement expliquée par une plus grande activité métabolique et une exposition aux facteurs de stress tels que le rayonnement solaire au niveau des thalles jeunes par rapport aux thalles plus âgés (Quilhot *et al.*, 1991a ; Quilhot *et al.*, 1998). Aussi, les variations de concentration en acide usnique entre différentes populations de lichen semblent être corrélées aux variations de facteurs climatiques ; en effet, l'influence des conditions environnementales, telles que la lumière, la température, l'humidité et l'altitude a été mise en évidence (Ravinskaya, 1991 ; Bjerke *et al.*, 2002). Des variations ont également été observées en fonction des saisons : les concentrations en acide usnique ont tendance à être plus élevées au printemps et plus faibles en automne, ce qui peut être corrélé aux différences d'intensité lumineuse (Quilhot *et al.*, 1991b ; Bjerke *et al.*, 2005).

Des dérivés de l'acide usnique sont également présents chez les lichens. Par exemple, les acides (-) et (+)-isousnique (Ingólfssdóttir, 2002), l'acide (-)-placodiolique (Connolly *et al.*, 1984 ; Millot *et al.*, 2013) et l'acide (-)-pseudoplacodiolique (Huneck *et al.*, 1981) ont été isolés à partir du lichen *Rhizoplaca chrysroleuca* (Figure 28).

A ce jour, l'acide usnique a été identifié uniquement chez les lichens mais certains de ses dérivés sont décrits chez des champignons. Par exemple, la (-)-mycousnine, une phytotoxine, et la (-)-cercosporamide, dérivé amidé de l'acide usnique, ont été isolés respectivement de *Mycosphaerella nawae* et *Cercosporidium henningsii* (Figure 29) (Sassa et Igarashi, 1990 ; Conover *et al.*, 1992).

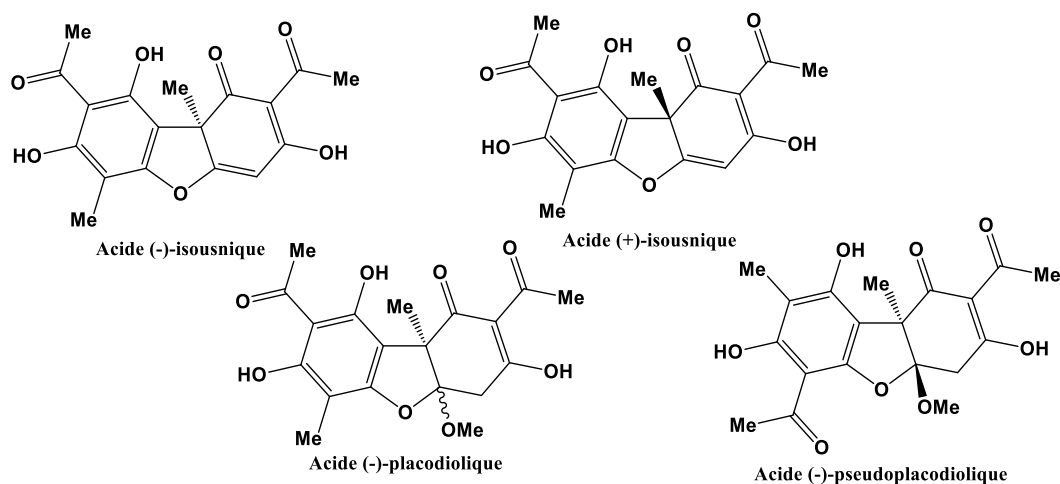


Figure 28 : Structures de quelques dérivés de l'acide usnique présents chez les lichens.

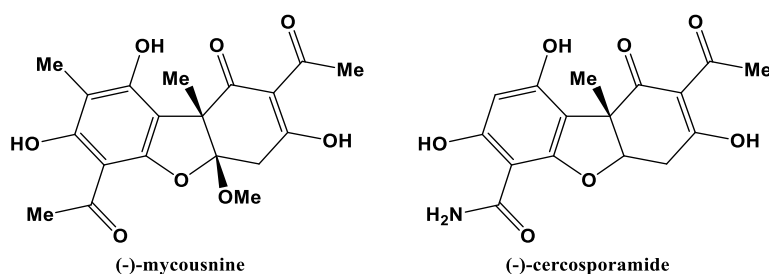


Figure 29 : Structures de deux dérivés de l'acide usnique : la (-)-mycousnine et de la (-)-cercosporamide.

Contrairement aux familles de métabolites secondaires citées précédemment, issues de la cyclisation d'un tétracétide linéaire, les anthraquinones, chromones et xanthones sont dérivées de la cyclisation de polycétides linéaires plus longs.

II.2.3. Les anthraquinones, naphtoquinones, chromones et xanthones

II.2.3.1. Les anthraquinones et naphtoquinones

Les anthraquinones, telles que l'émodine et l'endocrocine (Figure 30), proviennent de la cyclisation d'octacétides linéaires, et sont des pigments produits principalement par les hyphes du cortex supérieur. Elles sont également responsables de la couleur (jaune, orange, rouge...) des fructifications (apothécies) et représentent un large groupe parmi les métabolites lichéniques biologiquement actifs. La plupart de ces composés sont également présents chez d'autres organismes (Romagni et Dayan, 2002).

Les anthraquinones sont souvent produites par les lichens appartenant à la famille des *Teloschistes*, *Caloplaca* et *Xanthoria* (Stocker-Wörgötter *et al.*, 2013). Parmi elles, la pariétine, un

pigment jaune orangé isolé de *Xanthoria parietina* (Solhaug et Gauslaa, 1996), la draculone, un pigment rouge isolé de *Melanotheca cruenta* (Mathey *et al.*, 2002), et l'haematommone, un autre pigment rouge isolé de *Haematomma puniceum* (Huneck *et al.*, 1991), peuvent être cités (Figure 31).

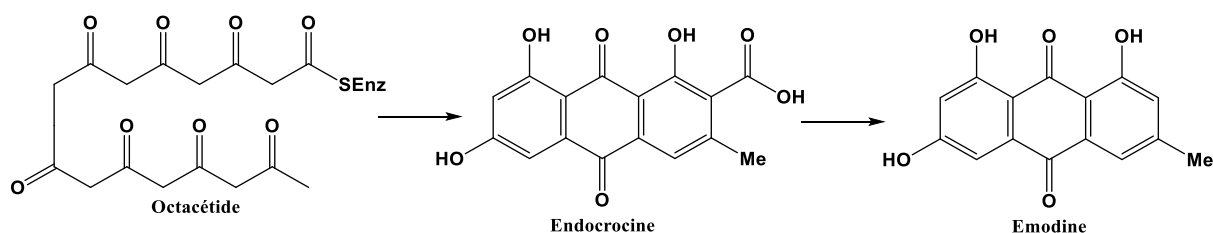


Figure 30 : Schéma de biosynthèse proposé pour les anthraquinones (Stocker-Wörgötter, 2008).

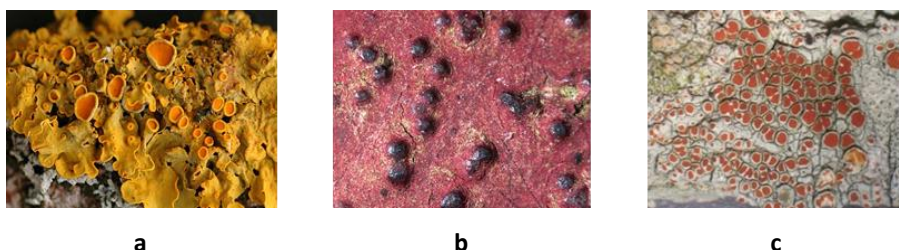
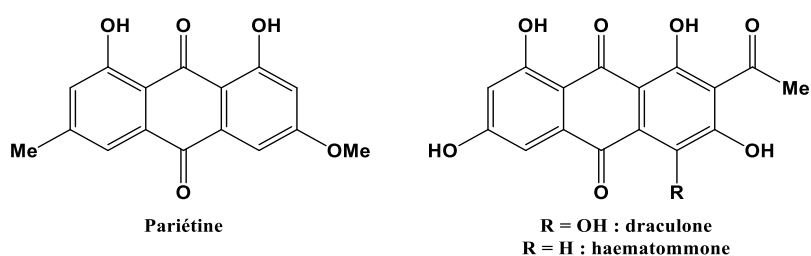


Figure 31 : Structures de quelques anthraquinones et photographies des lichens dont elles sont issues.

a : *Xanthoria parietina* (source : http://www2.ac-lille.fr/myconord/photos_afl/Photos_AFL_C.htm) ; b : *Melanotheca cruenta* (source : <http://www.seaveyfieldguides.com>) ; c : *Haematomma puniceum* (source : <http://www.waysofenlichenment.net>).

Les naphtoquinones sont également des pigments lichéniques communs, parmi lesquelles l'acide chiodectonique, l'haemoventosine (pigments rouges) et la squamarone (pigment orange) ont été isolés respectivement de *Cryptothecia rubrocincta* (Stocker-Wörgötter, 2008), de *Haematomma ventosa* (Bruun et Lamvik, 1971 ; Rycroft *et al.*, 1995) et de *Squamarina cartilaginea* (Himmelreich *et al.*, 1994) (Figure 32).

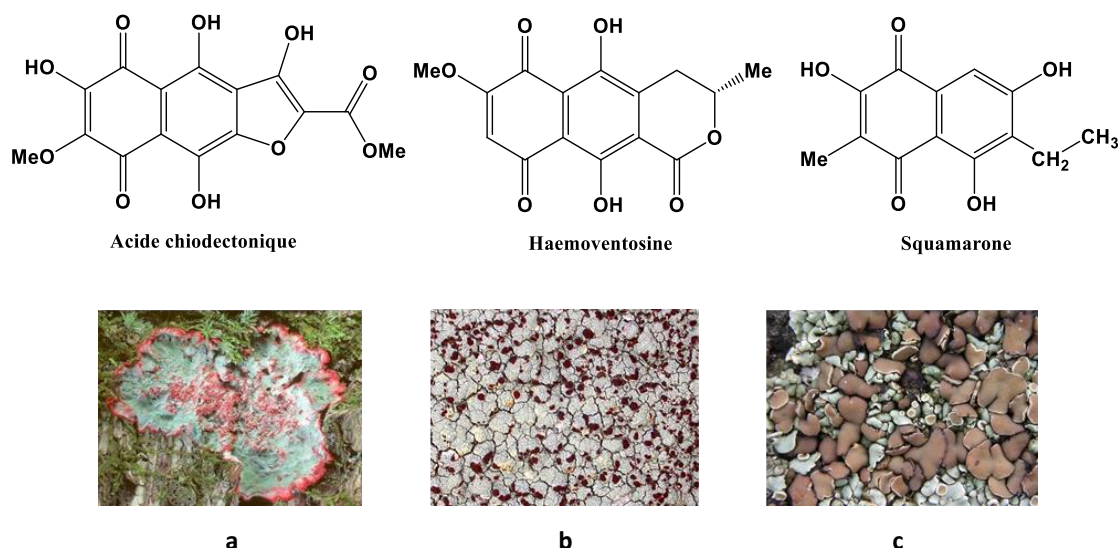


Figure 32 : Structures de quelques naphthoquinones et photographies des lichens dont elles sont issues.

a : *Cryptothecia rubrocincta* (source : <http://www.sharnoffphotos.com>) ; b : *Haematomma vantosa* (source : http://www2.ac-lille.fr/myconord/photos_afl/Photos_AFL_C.htm) ; c : *Squamarina cartilaginea* (source : http://www2.ac-lille.fr/myconord/photos_afl/Photos_AFL_C.htm).

II.2.3.2. Les chromones

Les chromones dérivent de la cyclisation de pentacétides linéaires (Figure 33) ; elles ne sont pas propres aux lichens et peuvent être retrouvées par exemple dans certains micro-organismes endophytes (Andrioli *et al.*, 2012).

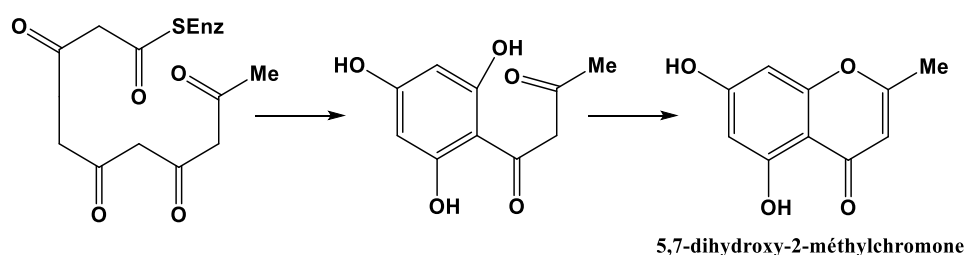


Figure 33 : Schéma de biosynthèse proposé pour les chromones (Romagni et Dayan, 2002).

Parmi les chromones retrouvées dans les lichens, l'eugénitine, isolée du mycobionte de *Lecanora rupicola* (Fox et Huneck, 1969), l'acide léprarique isolé de *Lepraria latebrarum* (Soviar *et al.*, 1967) et de *Rocella fuciformis* (Aberhart *et al.*, 1969), ainsi que la siphuline isolée de *Siphula ceratites* (Bruun, 1965), peuvent être cités (Figure 34).

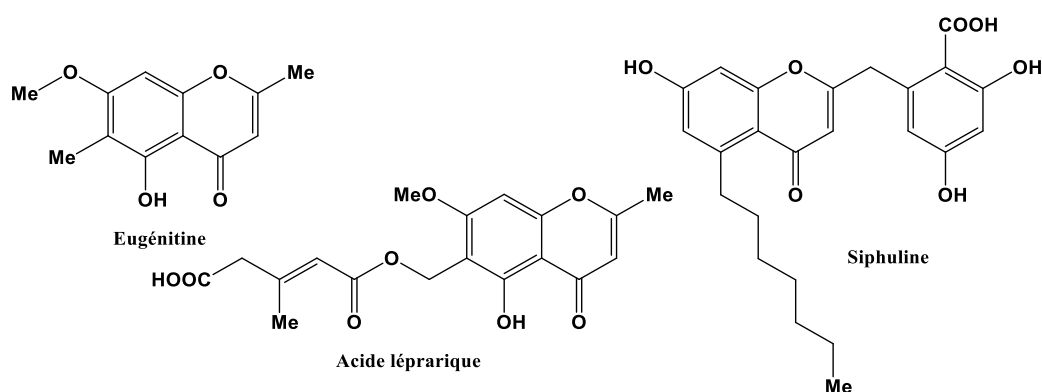


Figure 34 : Exemples de chromones isolées de lichens.

II.2.3.3. Les xanthones

Les xanthones (du grec *xanthos* : jaune) sont des métabolites secondaires qui ne sont pas exclusivement lichéniques (Figure 35). En effet, elles peuvent être retrouvées chez certaines plantes de la famille des Gentianacées ou des Guttifères (Vieira et Kijjoa, 2005). Par exemple, le mangoustanier (*Garcinia mangostana*) et ses fruits contiennent plusieurs dérivés de xanthones (Ragasa *et al.*, 2010 ; Al-Massarani *et al.*, 2013). Aussi, des xanthones sont décrites chez plusieurs espèces de champignons (Abdel-Lateff *et al.*, 2003 ; Kornsakulkarn *et al.*, 2013 ; Song *et al.*, 2013).

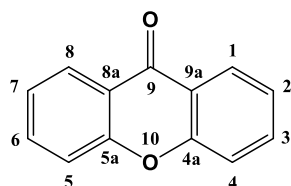


Figure 35 : Structure de base d'une xanthone.

Ces dernières années, plus d'une centaine de xanthones nouvelles ont été isolées de plantes, champignons ou lichens (Yang *et al.*, 2012). Elles sont très souvent substituées par des groupements hydroxyle, méthyle ou méthoxyle, et sont classiquement divisées en six groupes principaux (Negi *et al.*, 2013) : les xanthones oxygénées (divisées en six sous-groupes selon le degré d'oxydation : mono-, di-, tri-, tétra-, penta- et hexa-oxygénées), les xanthones glycosylées, les xanthones prénylées, les xanthonolignoides, les bis-xanthones et les xanthones diverses, possédant des substituants inhabituels. Auparavant dispersées dans les différents groupes, les xanthones chlorées ou chloroxanthones, du fait de leur présence restreinte notamment dans les lichens et de leurs activités biologiques particulières, forment un septième groupe à part entière (Fotie et Bohle, 2006).

Selon leur origine, les xanthones sont issues de voies de biosynthèse distinctes. En effet, chez les plantes supérieures, elles dérivent d'une voie de biogenèse « hybride », un des noyaux provenant

de la voie de l'acide shikimique, et l'autre noyau étant issu de la voie de l'acétate polymalonate. Ces deux moitiés se condensent pour donner une benzophénone, puis par réaction intramoléculaire une xanthone (Giallombardo *et al.*, 2014). Chez les lichens, la plupart des xanthes est dérivée de la norlichexanthone, dont le carbone en position 8 est substitué par un groupement méthyle. La voie de biosynthèse proposée pour ces métabolites implique la cyclisation d'une chaîne linéaire (octacétide) qui mène à l'obtention de la xanthone, avec la possibilité d'une benzophénone intermédiaire (Masters et Bräse, 2012). Au contraire, certaines xanthes plus inhabituelles, comme la raveneline issue du champignon *Helminthosporium ravenelii* (Raistrick *et al.*, 1936 ; Birch *et al.*, 1976), ou la thioméline isolée du lichen *Rinodena thiomela* (Elix *et al.*, 1987), possèdent un groupement méthyle en position 3. Dans ce cas, la cyclisation du polycétide impliquerait un intermédiaire anthrone ou anthraquinone dont le clivage oxydatif conduirait à la formation d'une benzophénone. Cette dernière mènerait soit directement à l'obtention de la xanthone, soit à l'obtention d'un intermédiaire xanthone polyhydrogénée (tétrahydroxanthone) subissant des réarrangements pour former la xanthone (Masters et Bräse, 2012) (Figure 36).

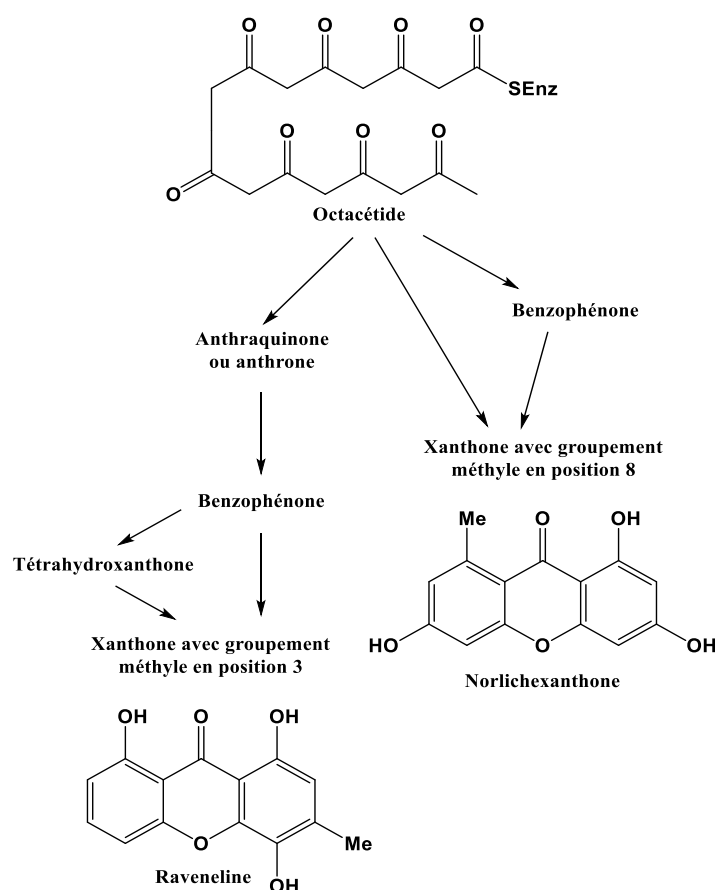


Figure 36 : Schéma de biosynthèse des xanthes chez les lichens.

La plupart des xanthones lichéniques sont des dérivés de norlichexanthone ou de lichexanthone, dont les structures diffèrent en fonction de la position et de la nature des substitutions (hydroxylation, méthylation des groupements hydroxyle, chloration). Elix et Crook ont suggéré que les chlorations et les méthylations régiosélectives impliquent la mise en jeu d'enzymes spécifiques (Elix et Crook, 1992).

La lichexanthone, première xanthone isolée à partir d'un lichen, a été identifiée chez *Parmelia formosa* (Asahina et Shibata, 1971), puis dans d'autres lichens tels que *Pyxine berteriana* (Maier *et al.*, 2009). Les xanthones dérivées de lichexanthone et de norlichexanthone sont très souvent chlorées. Sur près de 800 xanthones retrouvées dans la nature, 68 sont des chloroxanthones et sont essentiellement lichéniques (Dembitsky et Tolstikov, 2004).

Un certain nombre de dérivés de norlichexanthone est répertorié dans la littérature. Ainsi, des mono-, di- et trichloronorlichexanthes, telles que la 2-chloronorlichexanthone, la 4-chloronorlichexanthone, la 5-chloronorlichexanthone, la 2,4-dichloronorlichexanthone, la 5,7-dichloronorlichexanthone, la 2,4,7-trichloronorlichexanthone ou encore la 2,4,5-trichloronorlichexanthone, ont été isolées de plusieurs espèces de lichens des genres *Lecanora*, *Lecidella*, *Pertusaria*, *Buellia* et *Dimelaena* (Santesson, 1968 ; Elix *et al.*, 1991). Parmi les trichloronorlichexanthes, l'arthothéline et ses dérivés, ainsi que l'asémone et ses dérivés, ont été identifiés et isolés de plusieurs espèces de lichens (Figure 37) (Elix et Bennett, 1990 ; Elix et Crook, 1992 ; Lumbsch *et al.*, 1994).

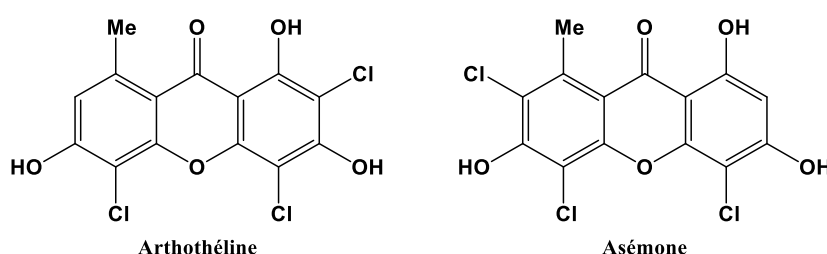


Figure 37 : Exemples de trichloronorlichexanones : l'arthothéline et l'asémone.

La présence de xanthones chlorées méthoxylées dérivées de norlichexanthone a également été mise en évidence dans plusieurs espèces de lichens. C'est le cas de la 2,5,7-trichloro-6-O-méthylnorlichexanthone et de la 4,5-dichloro-6-O-méthylnorlichexanthone par exemple (Elix *et al.*, 1991 ; Elix et Crook, 1992). Parmi les xanthones chlorées méthoxylées, la déméthylchodatine a été isolée des lichens des genres *Lecanora* et *Lecidella* (Elix *et al.*, 1994), la thuringione de lichens du genre *Pertusaria* et la vinétorine de *Lecanora vinetorum* (Huneck et Höfle, 1978) (Figure 38).

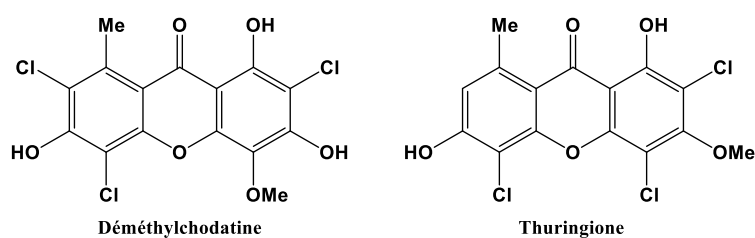


Figure 38 : Structures de certains dérivés chlorés méthoxylés de norlichexanthone.

Parmi les dérivés de lichexanthone (Figure 39), des chlorolichexanthones telles que la 2-chlorolichexanthone, la 4-chlorolichexanthone, la 5-chlorolichexanthone ou encore la 7-chlorolichexanthone, peuvent être citées. Des dichlorolichexanthones comme la 2,4-dichlorolichexanthone, la 2,7-dichlorolichexanthone, et des trichlorolichexanthones telles que la 2,5,7-trichlorolichexanthone, et la 2,4,7-trichlorolichexanthone, ont également été isolées de plusieurs espèces de lichens des genres *Lecanora*, *Pertusaria* et *Dimelaena* (Elix *et al.*, 1978 ; Huneck et Höfle, 1978 ; Elix et Crook, 1992).

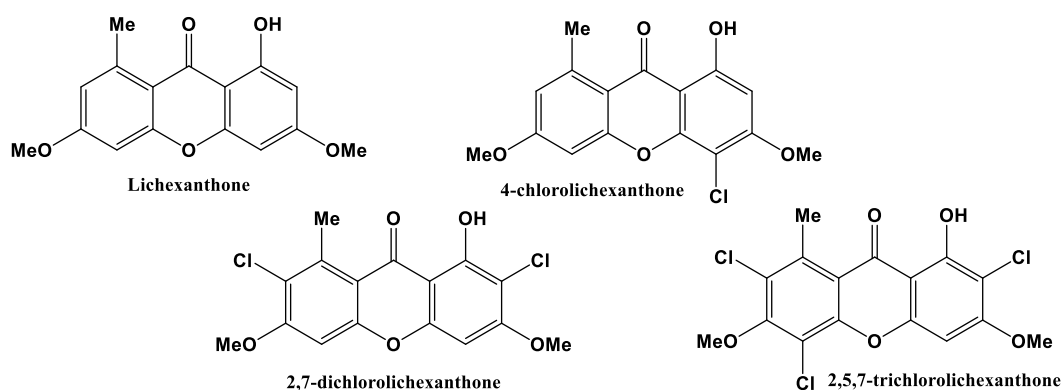


Figure 39 : Lichexanthone et certains de ses dérivés chlorés.

Parmi les xanthones lichéniques originales, l'érythromme, un dérivé acylé a été retrouvé dans le lichen *Haematomma erythroma* (Huneck et Höfle, 1978), et la thioméline, possédant un groupement méthyle en position 3, a été isolée de *Rinodena thiomela* (Elix *et al.*, 1987) (Figure 40).

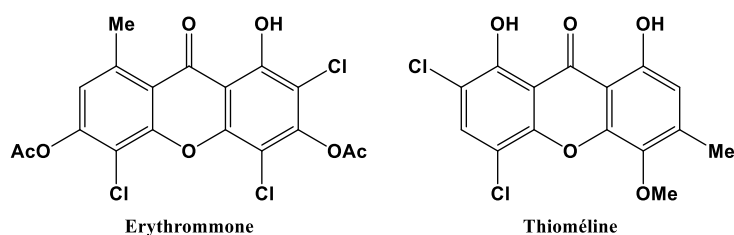


Figure 40 : Structures de l'érythromme et de la thioméline.

Plus récemment, des xanthones de structures atypiques ont été isolées de lichens. Ainsi, des xanthones prénylées glycosylées ont été décrites chez le lichen *Umbilicaria proboscidea* (Rezanka *et al.*, 2003) et un dimère de tétrahydroxyxanthone glycosylé, l'hirtusneanoside, a été isolé du lichen *Usnea hirta* (Rezanka et Sigler, 2007) (Figure 41).

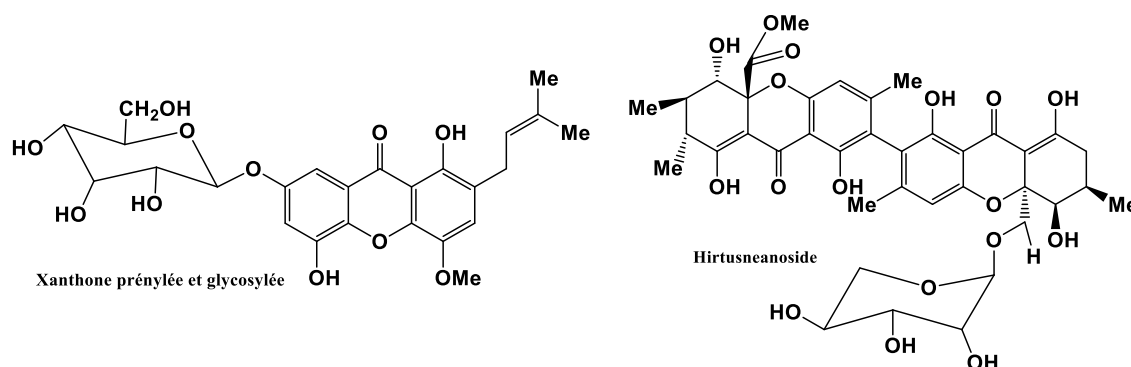


Figure 41 : Structures d'une xanthone prénylée glycosylée et de l'hirtusneanoside.

II.2.4. Les phthalides

Les phthalides, ou isobenzofuran-1-ones, sont des intermédiaires importants dans les stratégies de synthèse de métabolites lichéniques comme les naphtalènes, anthraquinones ou benzophénones (Sargent, 1987). Peu de phthalides sont décrits chez les lichens ; par exemple, le 5,7-dihydroxy-6-méthylphthalide et le 5,7-dihydroxy-6-formylphthalide (Figure 42) ont été isolés des lichens *Alectoria nigricans*, *Alectoria capillaris* et *Calvitimela armeniaca* (Solberg, 1970 ; Hertel et Andreev, 2003). On retrouve également ce type de composés chez certains champignons tels qu'*Alternaria porri* (Suemitsu *et al.*, 1995) et *Stachylidium* sp. (Almeida *et al.*, 2012).

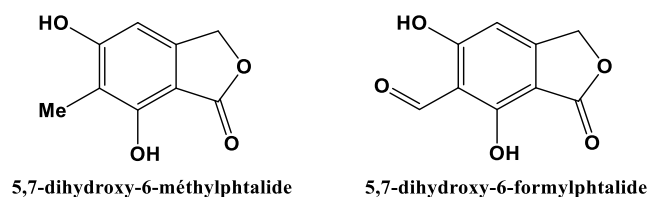


Figure 42 : Exemples de phthalides lichéniques.

Les lichens sont capables de synthétiser une large variété de métabolites secondaires qui leurs sont plus ou moins spécifiques. Ils sont considérés comme des organismes pionniers et de nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur des métabolites secondaires, en particulier dans l'aptitude des lichens à se développer dans des conditions environnementales extrêmes (Rundel, 1978).

Les lichens constituent donc une source de composés bioactifs nouveaux qui peuvent trouver des applications dans les domaines pharmaceutique ou cosmétique, en tant qu'agents antioxydants, antimicrobiens ou cytotoxiques (Zambare et Christopher, 2012). Au-delà de leurs utilisations en médecine traditionnelle, les lichens font donc l'objet, depuis plusieurs années, d'études visant à identifier leurs métabolites secondaires et à déterminer leurs activités biologiques.

II.3. Extraction, purification et identification des métabolites secondaires

II.3.1. Principales méthodes d'extraction

Les métabolites secondaires sont des molécules aliphatiques ou aromatiques de faible poids moléculaire présentant un caractère hydrophobe. Lorsqu'ils sont extraits, ils sont donc retrouvés principalement dans les fractions apolaires ou moyennement polaires.

En amont du processus d'extraction, les lichens récoltés sont débarrassés d'éventuels contaminants (mousses, terre, débris végétaux...). Puis, ils sont séchés, généralement à l'air ambiant pendant environ 72 heures, et sont réduits en poudre. En effet, le broyage permet d'augmenter la surface de contact entre le solvant et le lichen, et ainsi de favoriser l'extraction des composés.

L'extraction des métabolites secondaires est ensuite réalisée en tenant compte de la nature du solvant, du temps et de la température d'extraction. L'éther diéthylique (Culberson *et al.*, 1982), le dichlorométhane, le chloroforme (Carlos *et al.*, 2008 ; Polovinka *et al.*, 2012), le tétrahydrofurane, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le diméthylformamide (Asplund et Gauslaa, 2007), l'éthanol ou encore le méthanol (Ranković *et al.*, 2008) peuvent être employés. L'extraction peut être effectuée à température ambiante pendant plusieurs heures (Falk *et al.*, 2008 ; Vila *et al.*, 2011), à chaud (Soxhlet) (Din *et al.*, 2010) ou combinée aux ultrasons (Białońska et Dayan, 2005 ; Cetin *et al.*, 2008). Récemment, des études ont démontré que l'extraction par le tétrahydrofurane assistée par microondes est une méthode très efficace, en particulier pour les depsidones ; elle conduit à des rendements plus élevés et une meilleure sélectivité par rapport à l'extraction par chauffage classique. Cette technique permet de réduire considérablement le temps ainsi que le volume de solvant (Bonny *et al.*, 2009). La mise en œuvre de l'extraction assistée par microondes dans des liquides ioniques, permet encore de réduire le temps d'extraction avec des rendements supérieurs, et peut être effectuée sur de faibles quantités de matériel lichénique (Bonny *et al.*, 2011).

Afin d'effectuer une première séparation, un gradient de polarité peut également être mis en place en utilisant des solvants de polarité croissante. Ainsi, différentes séries d'extractions successives, en présence d'heptane, hexane, toluène, éther diéthylique, dichlorométhane, tétrahydrofurane,

acétone, acétate d'éthyle, méthanol, sont décrites dans la littérature (Eifler-Lima *et al.*, 2000 ; Millot *et al.*, 2007 ; Verma *et al.*, 2011 ; Millot *et al.*, 2012).

Enfin, une étude récente a montré que le rendement d'extraction total en métabolites secondaires ainsi que celui des deux composés étudiés (acide léprarique et érythrène) sont fortement dépendants de la méthode de broyage, du type d'extraction, du ratio solide/liquide et de l'intensité de l'agitation (Parrot *et al.*, 2014).

II.3.2. Purification des extraits et isolement des composés

II.3.2.1. Techniques de purification

Lors des étapes de purification, la solubilité et la polarité des métabolites secondaires lichéniques sont des contraintes majeures devant être prises en considération (Nikolić *et al.*, 2013).

D'une part, ces composés ont une solubilité limitée dans les solvants organiques usuels, dans lesquels ils ont tendance à précipiter. Si l'acide usnique ou les dibenzofuranes sont en général solubles dans le chloroforme, les depsides ou les depsidones, tels que les acides thamnolique ou protocétrarique, possèdent une solubilité optimale dans le diméthylsulfoxyde. Néanmoins, la solubilité limitée des métabolites peut être un moyen de les purifier ; en effet, une précipitation sur un extrait brut peut parfois permettre, comme dans le cas de l'acide usnique, d'obtenir directement le composé attendu pur (Sokolov *et al.*, 2012a).

D'autre part, les métabolites secondaires lichéniques, qu'il s'agisse de dibenzofuranes, depsides, depsidones, ou encore de xanthones, portent généralement plusieurs groupements polaires de type hydroxyle, acide, aldéhyde... (Huneck et Yoshimura, 1996). Des limites de purification sont donc rencontrées avec les méthodes de séparation utilisant des supports de silice polaire. Les techniques de purification sur phase inverse (C18 par exemple), en particulier la chromatographie liquide moyenne pression (CLMP) ou chromatographie éclair, et la chromatographie liquide haute performance (CLHP), se révèlent bien plus adaptées et efficaces pour la séparation des métabolites secondaires lichéniques (Millot *et al.*, 2013). Cependant, dans le cas de la CLHP préparative, des problèmes de colmatage des colonnes, dus à la faible solubilité des composés, peuvent être rencontrés en fonction des phases mobiles utilisées. L'ajout d'acide dans celles-ci, en faible proportion (pour ne pas endommager la phase stationnaire), permet d'éviter le colmatage.

Si la purification en phase inverse est bien adaptée, des techniques en phase normale sont également employées, telles que la purification sur colonne de silice, par chromatographie circulaire centrifuge (CCC), ou encore par chromatographie sur couche mince préparative (Lohézic-Le Dévéhat *et al.*, 2007). Une autre méthode utilisée pour les composés lichéniques est la chromatographie de

partage centrifuge (CPC) ; il s'agit d'une technique de chromatographie liquide-liquide, présentant l'avantage d'être sans support et qui permet donc de s'affranchir des problèmes de rétention des composés lichéniques rencontrés sur la silice (Roullier *et al.*, 2009).

Enfin, la séparation par exclusion stérique, sur gel de Sephadex LH-20 par exemple, peut aussi être utilisée et présente l'avantage de pouvoir être mise en œuvre avec des solvants organiques aqueux (Milot *et al.*, 2009).

II.3.2.2. Suivi de la purification

Le repérage des composés d'intérêt au cours de la purification peut s'effectuer de diverses manières. Les méthodes les plus usitées sont le suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) et par CLHP, en phase normale ou inverse.

Dans le premier cas, l'identification des composés se fait par comparaison de leurs rapports frontaux avec ceux des témoins, dans un éluant donné (Amo de Paz *et al.*, 2010). Pour une analyse CCM en phase normale, des mélanges de solvants de type toluène/acétate d'éthyle/acide formique ou hexane/éther éthylique/acide formique peuvent être utilisés. La présence d'acide dans les éluants limite la rétention des composés sur la silice et permet ainsi une meilleure résolution des spots.

Dans le second cas, les temps de rétention des composés de l'extrait et des témoins sont comparés, dans des conditions identiques (Manojlović *et al.*, 2012). Pour les métabolites secondaires lichéniques, l'analyse par CLHP est généralement réalisée avec une colonne remplie de phase inverse C18, très souvent couplée à un détecteur ultraviolet (UV) à barrette de diodes (UVBD). Deux principales publications traitent de la mise au point des conditions d'analyse en CLHP permettant une séparation optimale des composés lichéniques, en utilisant des mélanges eau/méthanol/acide orthophosphorique. Dans le premier cas, il s'agit d'appliquer un gradient d'élution (Feige et Lumbsch, 1993), alors que dans le second cas, l'analyse se fait en mode isocratique (Yoshimura *et al.*, 1994). Cette dernière méthode, plus simple à mettre en œuvre, a été utilisée au cours de ce travail.

Enfin, la chromatographie sur couche mince haute performance couplée à un spectrophotodensitomètre peut également être mise en œuvre pour détecter les composés et suivre la purification des extraits (Polónia *et al.*, 1991).

II.3.2.3. Fractionnement bioguidé des extraits

Les techniques de purification des extraits peuvent être associées à des tests biologiques afin d'effectuer du fractionnement bioguidé. Le bioguidage consiste à déterminer, tout au long de la purification, la ou les activités d'intérêt des différentes fractions obtenues.

Une des méthodes de criblage classiquement mise en œuvre est la bioautographie sur plaque de chromatographie couche mince ; il s'agit d'une technique semi-quantitative facile à mettre en œuvre, permettant la séparation et la détection simultanées des composés bioactifs présents dans un extrait (Choma et Grzelak, 2011). Différents types d'activités, telles que des activités antimicrobiennes, d'inhibition enzymatique (acétylcholinestérase, glucosidase), ou encore de piégeage des radicaux libres (DPPH, ABTS), peuvent être évalués par bioautographie (Marston, 2011). Appliquée aux souches microbiennes, cette méthode est largement utilisée pour le fractionnement d'extraits de plantes, mais peu de travaux sont reportés dans la littérature concernant les extraits de lichens (Yilmaz *et al.*, 2004 ; Santiago *et al.*, 2010).

Le principe repose sur la migration des composés vers le milieu de culture contenant le micro-organisme à tester. En premier lieu, les extraits sont déposés sur CCM, puis les plaques sont développées et bien séchées afin d'éliminer toutes traces de solvants. Le chromatogramme est ensuite mis en contact avec la souche d'intérêt selon trois méthodes possibles de bioautographie : de contact, directe et « agar overlay » (Marston, 2011).

Bioautographie de contact

Dans ce cas, la plaque de chromatographie couche mince est placée sur le milieu de culture gélosé, inoculé en surface, pendant quelques minutes ou heures pour permettre la diffusion des composés. Elle est ensuite ôtée, puis les micro-organismes sont mis à incuber. D'une manière générale, c'est la technique la plus utilisée mais la moins conseillée dans le cas de composés peu ou pas hydrosolubles, tels que les métabolites secondaires lichéniques.

Bioautographie directe

Après avoir été développées, les plaques CCM sont pulvérisées avec, ou immergées dans une suspension fongique ou bactérienne, avant d'être incubées. Cependant, des précautions sont requises afin d'éviter la dispersion des micro-organismes, en particulier dans le cas de la pulvérisation de bactéries ou champignons pathogènes.

Bioautographie « agar overlay »

Cette technique est considérée comme étant une combinaison entre les deux citées précédemment. Dans ce cas, la plaque CCM est immergée dans, ou recouverte par une fine couche de milieu de culture gélosé et inoculé par la souche microbienne à tester.

Dans les trois cas, l'incubation est généralement effectuée en atmosphère humide (afin d'éviter le dessèchement du milieu de culture), puis une révélation est réalisée par une solution aqueuse stérile de bromure de méthylthiazolyl-tétrazolium (MTT) (jaune) afin de visualiser les micro-organismes

vivants. Des zones d'inhibition de croissance blanchâtres mettent ainsi en évidence l'activité des composés sur la souche microbienne, alors que les micro-organismes vivants, capables de métaboliser les sels de tétrazolium en cristaux de formazan, sont révélés en violet (Figure 43).

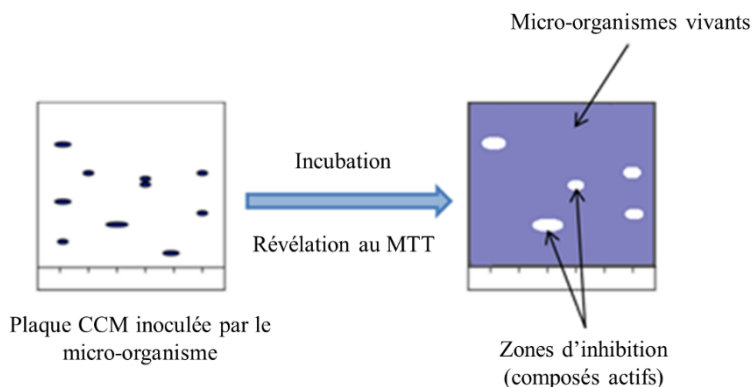


Figure 43 : Révélation des zones d'inhibition dans le cas des bioautographies directe ou "agar overlay".

La température et la durée d'incubation dépendent du micro-organisme.

II.3.3. Caractérisation et identification structurale des métabolites isolés

Une fois les composés isolés, leur structure est établie par des analyses par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) mono et bidimensionnelle (^1H , ^{13}C , COSY, HMQC, HMBC, NOESY...), ainsi que par spectrométrie de masse haute résolution (SMHR). Les molécules sont également caractérisées par leurs rapports frontaux dans des éluants donnés, leur spectre UV et infra-rouge (IR), leur point de fusion, leur pouvoir rotatoire...

Les métabolites lichéniques ainsi isolés pourront ensuite être soumis à divers tests selon les propriétés biologiques recherchées (antimicrobienne, antioxydante, anticancéreuse...) afin de déterminer des voies de valorisation potentielles. Si ces composés présentent des propriétés intéressantes, ils jouent avant tout un rôle primordial au sein même des lichens qui les synthétisent.

II.4. Propriétés biologiques et applications des métabolites secondaires lichéniques

II.4.1. Rôles écologiques

Au sein du lichen, les métabolites secondaires ont essentiellement un rôle de défense vis-à-vis des facteurs environnementaux physiques et biologiques : exposition intense à des rayonnements ultraviolets (UV), défense contre les herbivores, compétition pour l'habitat (effet allélopathique)...

Aussi, ces composés contribueraient à l'altération des roches afin de faciliter l'adhésion du lichen (Seaward, 1997 ; Lisci *et al.*, 2003).

II.4.1.1. Activités photoprotectrice et antioxydante

Un des mécanismes de protection des lichens est la production et l'accumulation de pigments corticaux capables d'absorber les UVA et UVB, préservant ainsi le partenaire photosynthétique des radiations excessives. Il s'agit de caroténoïdes, de mélanines, de composés phénoliques tels que les depsidones (acide lobarique, pannarine), les depsides (atranorine, acide gyrophorique), diphenyléthers (buelline), l'acide usnique, d'anthraquinones, de xanthones (bisxanthones telles que les acides sécaloniques), ou de composés issus de la voie de l'acide shikimique (acide vulpinique, calycine, mycosporines) (Rundel, 1978 ; Nguyen *et al.*, 2013). La plupart de ces métabolites secondaires est accumulée sous forme de cristaux sur la surface externe des hyphes dans le cortex supérieur ou dans la médulle interne du thalle (Boustie *et al.*, 2011).

Parmi les composés photoprotecteurs des lichens, la pariétine, une anthraquinone présente chez les lichens des genres *Xanthoria*, *Caloplaca* et *Teloschistes*, est largement décrite dans la littérature. Sa quantité au sein du lichen varie en fonction des saisons afin de protéger le photobionte des fortes radiations solaires (Solhaug et Gauslaa, 1996 ; Nybakken *et al.*, 2004 ; Gauslaa et McEvoy, 2005 ; Vráblíková *et al.*, 2006). Une étude a également démontré que la synthèse de pariétine induite par les radiations UV nécessite la présence d'eau (Solhaug *et al.*, 2003). Aussi, les xanthones, telles que l'arthotéline et l'acide thiophanique, joueraient un rôle dans la régulation des radiations reçues par le photobionte (Rundel, 1978). Certaines études ont mis en évidence la capacité de l'atranorine, de *Parmotrema hypotropum* et *Physcia aipolia*, à être un bon photoprotecteur (Fernández *et al.*, 1998 ; Armaleo *et al.*, 2008 ; Solhaug *et al.*, 2010). La pannarine et la sphaerophorine sont également capables de filtrer les radiations UV (Fernández *et al.*, 1998 ; Russo *et al.*, 2008) (Figure 44). Des variations de concentration en acide usnique en fonction des saisons et de l'intensité de l'irradiation ont été observées dans plusieurs espèces de lichen (Rundel, 1969 ; Rancan *et al.*, 2002 ; Bjerke *et al.*, 2005 ; Fernández *et al.*, 2006). Il jouerait donc lui aussi un rôle dans la photoprotection des lichens. De même, la calycine et l'acide rhizocarpique, retrouvés chez certains lichens fortement exposés aux UV comme *Pseudocyphellaria berberina* et *Acarospora schleicheri* (Hidalgo *et al.*, 2002 ; Rubio *et al.*, 2002), ainsi que des acides sécaloniques isolés du lichen *Diploicia canescens* (Milot *et al.*, 2009 ; Milot *et al.*, 2012) seraient de bons filtres UV (Figure 44). Enfin, chez les cyanolichens en particulier, des dérivés aminés de la famille des mycosporines sont décrits comme étant des photoprotecteurs prometteurs (Rezanka *et al.*, 2004 ; Torres *et al.*, 2004 ; Roullier *et al.*, 2011).

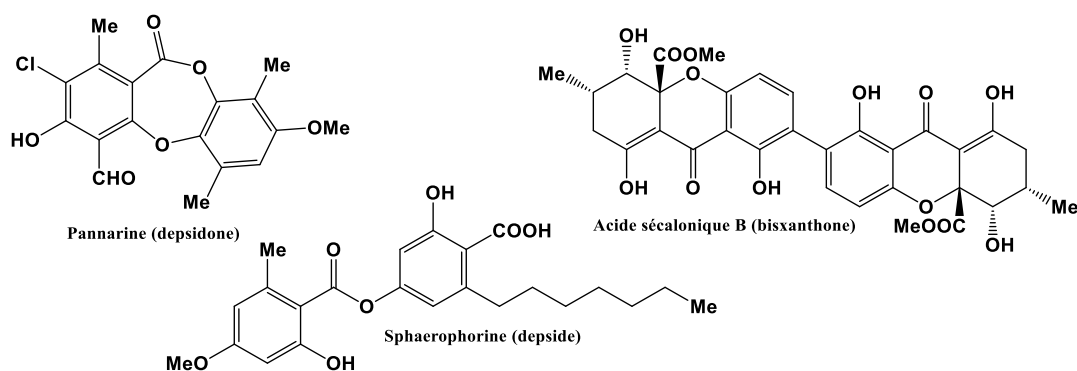


Figure 44 : Exemples de composés lichéniques photoprotecteurs.

Ces photoprotecteurs possèdent généralement une activité antioxydante intéressante ; certains composés tels que l'acide usnique, l'acide salazinique et l'acide stictique sont capables de protéger les lichens en piégeant les espèces réactives de l'oxygène générées par des radiations UV intenses (Amo de Paz *et al.*, 2010 ; Kohlhardt-Floehr *et al.*, 2010 ; Molnár et Farkas, 2010). Ainsi, ces composés peuvent trouver une valorisation en particulier en cosmétique dans des soins anti-âge ou des filtres solaires (Müller, 2001).

II.4.1.2. Tolérance à la pollution

Les métabolites secondaires peuvent jouer un rôle dans la résistance à la pollution des lichens (Figure 45). Afin d'éviter les effets toxiques notamment des métaux, certains composés sont capables d'inhiber ou de favoriser l'absorption de différents ions métalliques, mais aussi de les chélater en formant des complexes (Purvis, 2014).

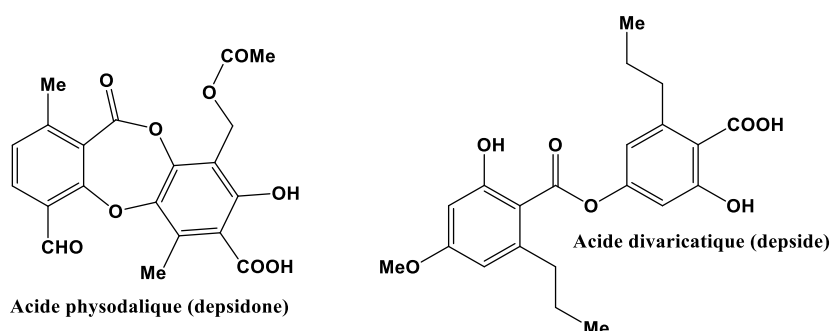


Figure 45 : Exemples de composés intervenant dans la tolérance des lichens à la pollution.

Par exemple, lorsque le lichen *Hypogymnia physodes* se développe sur un sol contaminé en métaux, des variations significatives des concentrations en atranorine, acide physodique, acide hydroxyphysodique et acide physodalique sont observées par rapport au même lichen se développant

sur un sol non pollué. Le taux d'acide physodanique augmente en présence de chrome, phosphore et de composés soufrés, tandis que les taux des autres composés diminuent. Cette molécule est donc impliquée dans la résistance du lichen à ce type de stress (Białońska et Dayan, 2005). Chez ce lichen, le rôle de l'acide fumarprotocétrarique a également été mis en évidence dans la tolérance au manganèse (Hauck et Huneck, 2007). De même, dans le cas des lichens *Evernia mesomorpha* et *Ramalina menziesii*, les acides usnique et divaricatique seraient responsables de l'augmentation de l'absorption intracellulaire des ions cuivre (II) Cu^{2+} et de la diminution de celle des ions manganèse Mn^{2+} (Hauck *et al.*, 2009b).

II.4.1.3. Effet allélopathique : activités phytotoxique et antimicrobienne

Certains métabolites secondaires lichéniques jouent également un rôle important dans la compétition car ils peuvent avoir une activité allélopathique, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'affecter le développement et la croissance des lichens, des champignons, des mousses, des micro-organismes et des plantes voisins. Cette concurrence en termes d'espace, de lumière sur des substrats variés est déterminante pour la structure des communautés lichéniques et pour la distribution des différentes espèces (Armstrong et Welch, 2007). L'effet allélopathique des composés lichéniques peut se manifester de différentes manières : il peut s'agir d'une activité phytotoxique et/ou antimicrobienne.

Concernant l'activité phytotoxique, des études ont mis en évidence que les acides usnique, vulpinique, squamatique et évernique sont capables d'inhiber la germination des spores de certaines espèces de mousses (Giordano *et al.*, 1997 ; Favero-Longo et Piervittori, 2010) et des graines de certaines plantes (Cardarelli *et al.*, 1997). L'acide usnique ainsi que d'autres métabolites tels que l'émodine, l'atranorine ou encore la prunastrine sont décrits pour avoir un effet sur le développement et la croissance de certaines plantes (Macías *et al.*, 2007). Chez le lichen *Cladonia cristatella*, l'acide usnique est identifié comme étant le composé allélopathique majeur, responsable de l'inhibition de croissance de certains champignons. De plus, d'autres métabolites secondaires présents chez ce même lichen, tels que les acides barbatique, didymique, condidymique, subdidymique, auraient un effet allélopathique (Goldner *et al.*, 1986).

Enfin, de nombreux métabolites, tels que l'acide lecanorique, l'acide physodique et l'atranorine, ont des propriétés antibiotiques prévenant la dégradation microbienne du thalle et l'infection par des bactéries pathogènes (Akpınar *et al.*, 2009 ; Molnár et Farkas, 2010). En effet, étant donné qu'ils croissent très lentement, les lichens auraient développé une défense chimique contre les micro-organismes. L'effet des composés de certaines espèces du genre *Cladonia* a été démontré sur des bactéries « décomposeurs » (Rundel, 1978). En inhibant ces bactéries, les lichens préservent ainsi un environnement, pauvre en nutriments, favorable à leur seul développement et donc à leur dominance.

Concernant l'acide unique, son activité antibiotique est considérée comme étant son principal rôle biologique au sein du lichen (Cochietto *et al.*, 2002). C'est pourquoi de nombreuses études s'attachent à déterminer son activité antimicrobienne et à développer son utilisation dans le domaine des industries pharmaceutique et cosmétique.

II.4.1.4. Activité antiherbivore

De manière générale, les lichens sont peu consommés par les herbivores, certainement du fait de leur faible valeur nutritionnelle et de la rareté de cette ressource. Néanmoins, dans plusieurs situations écologiques, les lichens constituent une ressource considérable pour les herbivores. Par exemple, dans les régions boréales de l'Hémisphère Nord, le lichen *Cladonia rangiferina* est la nourriture principale des rennes en hiver (Figure 46). Bien que les lichens soient peu nourrissants car pauvres en protéines, ils représentent une source de glucides facilement accessible lorsque le feuillage des plantes supérieures n'est pas disponible.



Figure 46 : *Cladonia rangiferina* (http://www2.ac-lille.fr/myconord/photos_afl/Photos_AFL_C.htm, J. Lagrandie) **et "tapis"** de ce lichen en Suède (<http://www.panoramio.com/photo/25529565>).

Les rennes ne consomment généralement pas les lichens contenant les acides fumarprotocétrarique, diffractaique, physodique, physodalique et salazinique (Des Abbayes, 1939 ; Rundel, 1978) ; cependant, des études récentes ont mis en évidence la présence, dans leur rumen, de souches bactériennes résistantes aux acides fumarprotocétrarique, lobarique et usnique. Ces micro-organismes seraient capables de croître en présence de concentrations importantes en acide usnique (jusqu'à 40 mg/mL) et cette tolérance est considérée comme une adaptation aux interactions entre rennes et lichens pendant des millions d'années (Sundset *et al.*, 2010 ; Glad *et al.*, 2014).

De même, lorsque deux espèces de *Cladonia* leurs sont proposées, certains acariens se nourrissent exclusivement de celle ne contenant pas d'acide fumarprotocétrarique (Figure 47) (Reutimann et Scheidegger, 1987). En effet, des études menées sur différentes espèces de lichens ont mis en évidence que certains métabolites secondaires sont capables de protéger les lichens contre les herbivores (Lawrey, 1989). Les expérimentations décrites consistent à rincer les lichens par l'acétone

pour diminuer la concentration en métabolites secondaires. Ensuite, la consommation des lichens traités et non traités (témoins) par différents types d'herbivores est observée. Ainsi, des travaux effectués sur des insectes (Emmerich *et al.*, 1993 ; Nimis et Skert, 2006), des escargots (Gauslaa, 2005 ; Černajová et Svoboda, 2014), des limaces (Coker, 1967) et sur des campagnoles roussâtres (Nybakken *et al.*, 2010), ont démontré le rôle antiherbivore de plusieurs composés tels que l'atranorine, les acides fumarprotocétrarique, picrolichénique, lecanorique, gyrophorique, vulpinique, pinastrique et usnique, des dérivés de l'acide pulvinique, ainsi que la zéorine et la skyrine.

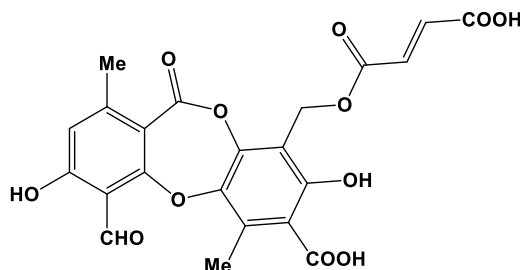


Figure 47 : Structure de l'acide fumarprotocétrarique possédant une activité antiherbivore.

Les produits d'origine naturelle étant connus pour avoir un impact moindre sur l'environnement par rapport aux produits de synthèse, les substances lichéniques citées précédemment pourraient donc être de bons candidats pour la formulation de nouveaux pesticides (insecticides en particulier) (Dayan et Romagni, 2002).

Les métabolites secondaires jouent donc un rôle notable quant à la survie et au développement des lichens. C'est la raison pour laquelle, depuis quelques décennies, l'étude des lichens et la valorisation commerciale des composés bioactifs qui en seraient isolés, dont l'acide usnique, suscitent un intérêt grandissant.

II.4.2. Propriétés biologiques : cas de l'acide usnique

Les applications des lichens étant bien connues, les propriétés biologiques de différents types d'extraits lichéniques (méthanolique, acétonique...) font l'objet d'une multitude de travaux. Les activités biologiques des métabolites secondaires lichéniques isolés sont également décrites ; le composé lichénique le plus étudié est de loin l'acide usnique, dont les multiples activités feront ici l'objet d'une description plus détaillée.

II.4.2.1. Activité antimicrobienne

Pour les industries pharmaceutiques, la recherche de nouveaux antibiotiques est une préoccupation majeure en termes de santé publique. Un antibiotique est une substance chimique ayant une activité bactéricide (entraîne la mort) ou bactériostatique (empêche la croissance) sur des micro-organismes pathogènes, et permettant de traiter des infections. Les agents antimicrobiens peuvent être extraits de micro-organismes (gentamicine), produits par hémisynthèse (ampicilline) ou encore par synthèse totale (ciprofloxacine) (Figure 48).

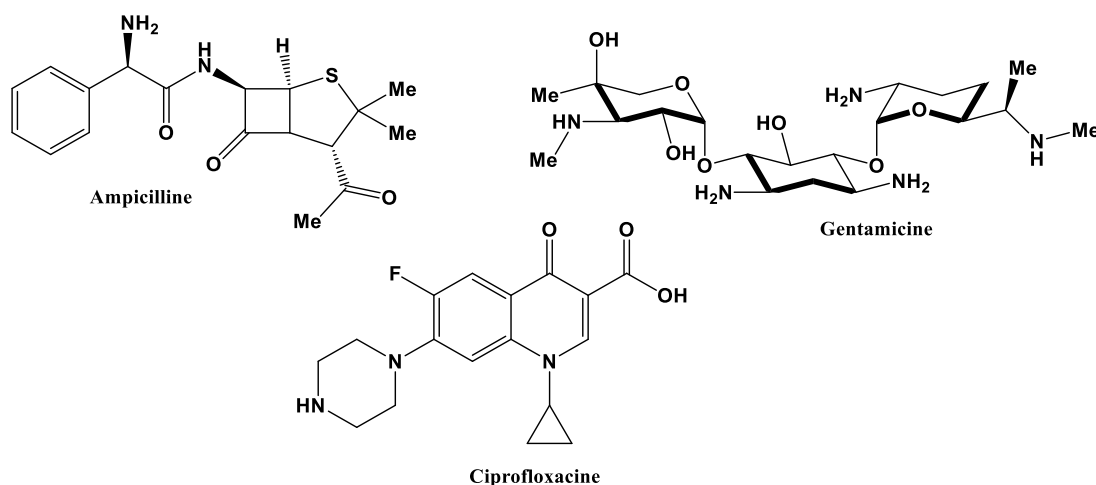


Figure 48 : Exemples de structures d'antibiotiques. Plusieurs sources possibles : composé naturel (gentamicine), ou composés issus d'hémisynthèse (ampicilline) ou de synthèse (ciprofloxacine).

Cependant, le développement de souches microbiennes résistantes aux antibiotiques conduit les industriels à développer de nouveaux composés. La modification chimique de classes d'antibiotiques connus étant largement utilisée, de nombreux composés existent dans chacune de ces classes (D'Urso de Souza Mendes et de Souza Antunes, 2013). Le Tableau 1 présente les classes d'antibiotiques couramment utilisées (adapté de Davies et Davies, 2010).

Tableau 1 : Principales classes d'antibiotiques couramment utilisées (adapté de Davies et Davies, 2010).

Classes	Exemples
β -lactamines	Pénicillines (ampicilline), céphalosporines (céphamycine), pénèmes (méropénème), monobactames (aztréoname)
Aminoglycosides	Gentamicine, streptomycine, spectinomycine
Glycopeptides	Vancomycine, téicoplanine
Tétracyclines	Minocycline, tigécycline
Macrolides	Erythromycine, azithromycine
Lincosamides	Clindamycine
Streptogramines	Synercide
Oxazolidinones	Linézolide
Phénicols	Chloramphénicol
Quinolones	Ciprofloxacine
Pyrimidines	Triméthoprim
Sulfonamides	Sulfaméthoxazole
Rifamycines	Rifampicine
Lipopeptides	Daptomycine
Peptides cationiques	Colistine

La modification chimique de composés existants n'est pas la seule alternative au développement de nouveaux antibiotiques. En effet, de nombreuses recherches se tournent vers l'étude d'extraits et de composés issus de micro-organismes ou de végétaux. Les lichens sont moins étudiés mais suscitent un intérêt grandissant au vue des composés bioactifs qu'ils synthétisent. De nombreuses publications traitent notamment de l'activité antimicrobienne de l'acide usnique sur plusieurs souches microbiennes dont *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* pour les bactéries, et des *Aspergillus*, *Candida* pour les champignons et levures.

Les activités antimicrobiennes sont généralement déterminées par diffusion (méthode des disques, principe de l'antibiogramme) ou par dilution en milieu liquide (Figure 49), qui permettent de déterminer, pour chaque échantillon, la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), concentration la plus faible permettant l'inhibition totale de la croissance microbienne (Andrews, 2001).

La méthode de diffusion utilise classiquement des disques de papier filtre imprégnés de concentrations croissantes en échantillon. Il s'agit d'une technique de contact impliquant la diffusion des molécules testées dans le milieu de culture gélosé : les disques imprégnés sont déposés à la surface de géloses inoculées par le micro-organisme étudié. Après incubation, les zones d'inhibition de croissance sont mesurées et permettent d'évaluer l'activité antimicrobienne (Rios *et al.*, 1988).



Figure 49 : Exemple d'un test d'activité antimicrobienne par la technique des disques (à gauche) et microplaque 96 puits couramment utilisée pour la technique en milieu liquide (à droite).

Concernant la méthode de dilution, l'échantillon est solubilisé dans le milieu de culture puis mis en contact directement avec l'inoculum microbien. Afin de tester un maximum de concentrations par échantillon, cette technique est souvent effectuée en microplaques 96 puits. Après incubation, l'activité antimicrobienne est estimée par mesure des densités optiques au spectrophotomètre, ou par comptage des micro-organismes après dilution et étalement sur milieu gélosé en boîte de Pétri.

II.4.2.1.a. Activité antibactérienne

Face au développement de formes résistantes de bactéries vis-à-vis des traitements antibactériens conventionnels, les métabolites lichéniques sont étudiés comme alternatives. En effet, plus de 50 % des lichens possèderaient une activité antibiotique et représenteraient donc une source importante de nouveaux composés bioactifs (Zambare et Christopher, 2012).

Historiquement, l'activité antibactérienne d'extraits lichéniques est reportée pour la première fois par Burkholder ; sur 42 espèces de lichens testées, en particulier des *Cladonia*, 27 se sont révélées actives contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (Burkholder *et al.*, 1944). Plus généralement dans la littérature, les activités antibactériennes des extraits de lichens varient en fonction des solvants utilisés pour les extractions ainsi que des bactéries testées et notamment de la composition de leur membrane, différente chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les premières sont généralement plus sensibles à l'activité antibiotique des métabolites lichéniques que les secondes (Rowe *et al.*, 1989). Les bactéries à Gram positif des genres *Bacillus* et *Staphylococcus*, et les bactéries à Gram négatif des genres *Escherichia*, *Pseudomonas* et *Klebsiella* sont les plus couramment étudiées. Des tests sont également réalisés sur les bactéries du genre *Mycobacterium*. L'acide usnique est le composé lichénique le plus largement étudié et, de manière générale, l'activité antibactérienne de ses deux isomères (+) et (-) sont similaires sur les bactéries à Gram positif et sur les mycobactéries (Lauterwein *et al.*, 1995 ; Ingólfssdóttir, 2002). Ces dernières constituent une famille bactérienne particulière ; elles se différencient des bactéries à Gram positif et à Gram négatif par la présence d'une paroi riche en acides gras. Les arabinogalactanes liés de façon covalente au peptidoglycane (aussi appelé muréine) sont estérifiés par des acides mycoliques (acides gras à longues chaînes) pour former

des cires (Hett et Rubin, 2008). La paroi est ainsi particulièrement hydrophobe, ce qui rend difficile la pénétration des agents colorants et décolorants classiquement utilisés pour les bactéries à Gram positif et négatif. D'autres techniques de coloration sont donc employées dans le cas des mycobactéries telles que la méthode de Ziehl-Neelsen.

Activité vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif

L'extrait acétonique de *Flavoparmelia caperata*, qui contient 2,4 % d'acide (+)-usnique par rapport à sa masse sèche, a une activité importante sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium* (Cansaran Duman, 2009). Les acides protocétrarique et usnique, isolés de ce lichen sont actifs en particulier sur les souches de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus* sp. avec des CMI comprises entre 0,8 et 125 µg/mL (Ranković et Mišić, 2008 ; Manojlović *et al.*, 2012). L'acide (+)-usnique a également été testé sur cinq souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques avec des CMI comprises entre 8 et 16 µg/mL (Kokubun *et al.*, 2007).

Une autre étude a mis en évidence l'activité antibactérienne de l'acide (+)-usnique sur *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus* et *E. coli* avec des CMI respectives de 8, 8, 31 et 31 µg/mL (Sultana et Afolayan, 2011). L'activité anti-caries d'extraits du lichen *Usnea pictoides* a été démontrée sur *Streptococcus mutans* et est attribuée à l'acide (+)-usnique présent dans ces extraits (Prashith Kekuda *et al.*, 2013). Une autre étude a souligné l'effet de l'acide (+)-usnique sur la formation de biofilms de *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats mettent en évidence qu'il inhibe la formation de biofilm de *S. aureus*, même en présence de concentrations importantes en bactéries. Concernant *P. aeruginosa*, le biofilm se forme mais sa structure est altérée et hétérogène (Francolini *et al.*, 2004). Enfin, des travaux récents sont décrits concernant l'utilisation de polyacrylamides hydrosolubles ; ces polymères sont capables de complexer l'acide usnique, insoluble dans l'eau, et d'en améliorer ainsi la biodisponibilité. Le complexe acide usnique-polymère formé a été testé sur *Staphylococcus epidermidis* et a montré une activité antibactérienne supérieure à celles de l'acide usnique ou du polymère seuls, les meilleurs résultats étant obtenus avec les complexes de plus petite taille (60 nm). En effet, leur taille réduite permettrait une absorption cellulaire plus efficace (Francolini *et al.*, 2013).

Les acides didymique et condidymique, dibenzofuranes de structures proches de l'acide usnique, ont été isolés du lichen *Cladonia rangiferina* et sont actifs sur des souches résistantes de *S. aureus* et d'*Enterococcus faecium* (Yoshikawa *et al.*, 2008).

Activité vis-à-vis des bactéries du genre Mycobacterium

L'activité des extraits de certains lichens et de l'acide usnique a aussi été déterminée sur *Mycobacterium tuberculosis*, micro-organisme responsable de la tuberculose (Ramos et Almeida da

Silva, 2010). Les acides usnique et protocétrarique ont été testés sur cette souche et leurs CMI respectives ont été évaluées à 62,5 µg/mL et 125 µg/mL (Honda *et al.*, 2010). L'activité de l'acide usnique a été mise en évidence sur une autre souche de *Mycobacterium*, *M. aurum*, avec une CMI de 32 µg/mL (Ingólfssdóttir *et al.*, 1998). L'extrait acétonique du lichen *U. steineri* affiche des CMI de 32 µg/mL contre *M. tuberculosis*, et de 62 µg/mL contre *M. kansasii* et *M. avium*. L'acide (+)-usnique isolé de ce même extrait a une activité plus intense avec des CMI de 16 µg/mL contre *M. avium* et 8 µg/mL contre les deux autres souches (Lucarini *et al.*, 2012).

II.4.2.1.b. Activité antifongique

Certains métabolites secondaires peuvent être actifs sur différentes souches de champignons et de levures. L'acide (+)-usnique, isolé du lichen *Usnea florida*, montre une activité antifongique sur *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes* avec des CMI entre 100 et 250 µg/mL (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2008). Aussi, il inhibe la croissance de *Fusarium moniliforme* (Cardarelli *et al.*, 1997) mais il a également un effet antifongique intéressant sur *Candida orthopsilosis* et *C. parapsilosis* à l'état planctonique et de biofilm (Pires *et al.*, 2012). L'acide (-)-usnique inhibe la croissance, en particulier de *Pythium ultimum*, *Ustilago maydis* et *Phytophthora infestans*, contrairement à l'acide (+)-usnique qui ne montre aucune activité sur cette dernière souche (Halama et Van Haluwyn, 2004). L'acide (-)-usnique inhibe également la croissance de *Candida glabrata* et *Candida albicans* (Yilmaz *et al.*, 2004). Enfin, l'activité de l'acide (-)-usnique a été mise en évidence sur *Penicillium frequentans* et *Verticillium albo-atrum* (Proska *et al.*, 1996).

II.4.2.1.c. Mécanismes d'action de l'acide usnique

Si l'acide usnique présente une activité antimicrobienne largement démontrée, les mécanismes d'action qui en sont à l'origine n'en demeurent pas moins inconnus. Les différents modes d'action de l'acide usnique proposés dans la littérature concernant les bactéries à Gram positif.

Un premier mécanisme impliquerait la perturbation des fonctions de la membrane cellulaire (Variati, 2010). Des travaux réalisés sur l'acide (-)-usnique confirment cette hypothèse et indiquent que le mécanisme d'action primaire, vis-à-vis de souches résistantes de *S. aureus*, n'est pas la lyse de la membrane mais une perturbation de cette dernière : l'acide usnique en modifierait la perméabilité et affecterait sa capacité à réguler les échanges osmotiques (Gupta *et al.*, 2012).

Cependant, une étude plus récente réalisée sur *S. aureus* et *B. subtilis* (bactéries à Gram positif), ainsi que sur *Escherichia coli* et *Vibrio harveyi* (bactéries à Gram négatif) apporte des pistes nouvelles quant au mode d'action de l'acide usnique sur les bactéries (Maciąg-Dorszyńska *et al.*, 2014). Les

auteurs ont mis en évidence les cinétiques de synthèse de l'ADN, ARN et protéines en mesurant l'incorporation de certains de leurs précurseurs radioactifs respectifs : [^3H]thymidine, [^3H]uridine et [^3H]leucine. Dans le cas d'*E. coli*, résistante à l'acide usnique, aucune inhibition de la synthèse d'ADN, ARN et protéines n'a été observée. Concernant *V. harveyi*, souche pour laquelle la croissance bactérienne est faiblement affectée par l'acide usnique, une légère diminution de la synthèse d'ARN a été mise en évidence. Enfin, pour les bactéries à Gram positif, *S. aureus* et *B. subtilis*, sensibles à l'action de l'acide usnique, l'inhibition la plus précoce est celle de la synthèse de l'ARN suivie de celle de l'ADN, l'inhibition de la synthèse des protéines étant retardée.

Les résultats obtenus suggèrent fortement que l'inhibition de la synthèse d'ARN et d'ADN est un effet direct de l'acide (+)-usnique sur les bactéries (Figure 50). L'interférence dans la synthèse d'ARN, et donc sur la transcription, serait le mécanisme principal expliquant l'activité antibactérienne de l'acide usnique, conjointement à l'altération de la répllication de l'ADN. Les dommages sur la synthèse de protéines (effet indirect) seraient une conséquence de l'inhibition de la production d'ARN.

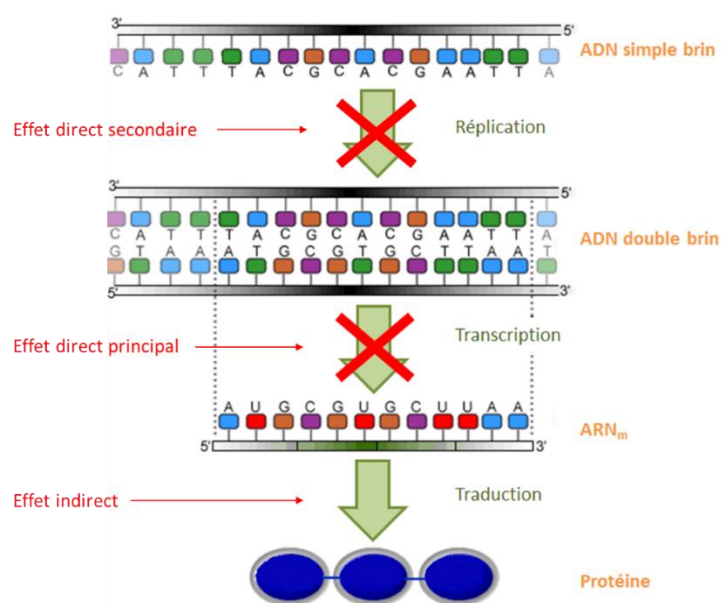


Figure 50 : Mécanismes d'action de l'acide usnique, en particulier sur les bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *B. subtilis*), proposés par Maciąg-Dorszyńska *et al.* (2014).

Une étude antérieure indique que l'activité antivirale de l'acide usnique est due à un mode d'action similaire impliquant une inhibition de la transcription d'ARN et la suppression de la répllication d'ADN (Campanella *et al.*, 2002). Des travaux récents sur le thymus de veau ont également démontré qu'il est capable d'interagir et de se lier à l'ADN avec une affinité élevée (Plsíková *et al.*, 2014).

II.4.2.2. *Activité antioxydante*

Les antioxydants de synthèse tels que le BHT (2,6-di-*tert*-butyl-4-méthoxyphénol) ayant été remis en cause sur le plan toxicologique (Olsen, 1986), de nombreux travaux se sont orientés vers la recherche d'antioxydants naturels. Au sein du lichen, les métabolites secondaires, dont les depsidones et depsides, généralement plus antioxydants que l'acide usnique (Hidalgo *et al.*, 1994 ; Lohézic-Le Dévéhat *et al.*, 2007), jouent un rôle contre le stress oxydatif. Ces molécules peuvent trouver des applications en tant que conservateurs ou photoprotecteurs dans les cosmétiques (Thadhani *et al.*, 2011). L'activité antioxydante regroupe différents modes d'action tels que la capacité à piéger les radicaux libres pouvant être engagés dans la peroxydation lipidique, et l'aptitude à réduire des métaux impliqués dans des réactions générant des radicaux.

Les résultats reportés dans la littérature concernant l'acide usnique sont contradictoires. Selon certaines études, il est actif en termes de piégeage des radicaux libres et d'inhibition de la peroxydation lipidique (Susithra *et al.*, 2011 ; Behera *et al.*, 2012 ; Verma *et al.*, 2012). L'activité antioxydante serait en partie responsable de son effet gastroprotecteur chez le rat (Odabaşoğlu *et al.*, 2006) et limiterait les dommages oxydatifs liés aux désordres neurodégénératifs associés aux maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Amo de Paz *et al.*, 2010). Selon une autre étude, son activité sur la peroxydation lipidique et vis-à-vis des radicaux DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et hydroxyle serait faible (Kumar et Müller, 1999). D'autres travaux ont mis en évidence une activité sur les radicaux oxyde nitrique et superoxyde mais une absence d'activité sur le DPPH (Thadhani *et al.*, 2011 ; Brisdelli *et al.*, 2013). Enfin, dans certaines conditions expérimentales, l'activité pro-oxydante de l'acide usnique a été démontrée (Kohlhardt-floehr *et al.*, 2010 ; Atalay *et al.*, 2011).

II.4.2.3. *Autres activités*

Outre les activités antibactérienne, antifongique et antioxydante, d'autres propriétés biologiques sont décrites dans la littérature concernant l'acide usnique. Il s'agit entre autres d'activités anticancéreuse, antivirale, antiprotozoaire ou encore anti-inflammatoire.

II.4.2.3.a. *Activité anticancéreuse*

Certains métabolites présentent une activité antiproliférative et cytotoxique vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines et murines. De manière générale, les mécanismes d'action sur les cellules cancéreuses incluent l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la nécrose et l'inhibition de l'angiogenèse (Shrestha et St Clair, 2013).

L'acide (+)-usnique possède une activité antiproliférative sur de nombreuses lignées de cellules cancéreuses, telles que des cellules leucémiques, de mélanomes, d'adénocarcinomes, d'hépatoblastomes... (Cardarelli *et al.*, 1997 ; Koparal *et al.*, 2006 ; Bazin *et al.*, 2008 ; Burlando *et al.*, 2009 ; Bessadottir *et al.*, 2012 ; Brisdelli *et al.*, 2013 ; Gardini Brandão *et al.*, 2013). L'activité de l'acide (-)-usnique sur différents types de cellules cancéreuses est également décrite dans la littérature (Kupchan et Kopperman, 1975 ; Bézivin *et al.*, 2004). Selon une étude effectuée sur des cellules de carcinome de poumons humains, l'administration de nanocapsules contenant de l'acide usnique permettrait d'améliorer la biodisponibilité de ce composé et de diminuer son hépatotoxicité (Santos *et al.*, 2005). D'autres méthodes décrites concernent la complexation de l'acide usnique avec des cyclodextrines (Kristmundsdóttir *et al.*, 2002 ; Nikolić *et al.*, 2013).

Enfin, différents modes d'action de l'acide usnique sur les cellules tumorales sont reportés ; il peut induire l'inhibition de l'angiogenèse (Song *et al.*, 2012), un dysfonctionnement mitochondrial (Sahu *et al.*, 2012), l'apoptose (Bačkorová *et al.*, 2011 ; Bačkorová *et al.*, 2012), et l'inhibition de la synthèse d'ADN (Einarsdóttir *et al.*, 2010).

II.4.2.3.b. Activité antivirale

L'activité antivirale de l'acide usnique a été démontrée par quelques travaux. Les extraits éthanoliques de différentes espèces d'*Usnea*, riches en acide usnique, sont actifs sur le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV1) et le poliovirus de type 1 (PV1) (Perry *et al.*, 1999). L'activité antivirale de l'acide (+)-usnique a été mise en évidence sur le papillomavirus (étude clinique) (Scirpa *et al.*, 1999), sur le polyomavirus chez la souris (Campanella *et al.*, 2002), et sur l'arenavirus JUNV responsable de la fièvre hémorragique d'Argentine (Fazio *et al.*, 2007). Concernant le virus Epstein-Barr, impliqué dans la formation de tumeurs cancéreuses, l'acide (+)-usnique est plus efficace que l'acide (-)-usnique (Yamamoto *et al.*, 1995), alors que dans le cas de l'influenzavirus A (H1N1), c'est l'acide (-)-usnique qui se révèle être le plus actif (Sokolov *et al.*, 2012b).

II.4.2.3.c. Activité antiprotozoaire

L'activité antiprotozoaire de l'acide usnique est peu renseignée dans la littérature. Cependant, certaines études *in vitro* sont reportées. Par exemple, il a été montré *in vitro* que l'extrait aqueux de *Cladonia alpestris* ainsi que l'acide (-)-usnique possèdent, à de faibles concentrations, une forte activité sur *Trichomonas vaginalis*, parasite responsable de la trichomonose uro-génitale (Wu *et al.*, 1995). L'effet de l'acide (+)-usnique sur trois souches de *Leishmania* a également été mis en évidence *in vitro* (Fournet *et al.*, 1997). De plus, l'acide usnique isolé de *Cladonia substellata* inhibe la croissance de

Trypanosoma cruzi, agent pathogène de la maladie de Chagas (De carvalho *et al.*, 2005). Plus récemment, des travaux ont décrit l'activité de l'acide (+)-usnique (Lauinger *et al.*, 2013), ainsi que l'effet d'un de ses dérivés sur *Plasmodium berghei* et *P. falciparum* (Bruno *et al.*, 2013b).

II.4.2.3.d. Activité anti-inflammatoire

Peu d'études sont décrites concernant l'activité anti-inflammatoire de l'acide usnique. Des travaux effectués sur des rats ont démontré que l'acide (+)-usnique possède une efficacité significative et similaire à celle de l'ibuprofène (Ôtsuka *et al.*, 1972 ; Vijayakumar *et al.*, 2000).

II.4.2.3.e. Activité cicatrisante

Les effets de l'acide usnique sur le phénomène de cicatrisation sont décrits dans la littérature depuis quelques années seulement, au travers d'expérimentations *in vitro* ou *in vivo*. Dans le premier cas, il s'agit de réaliser des essais de type « scratch test » permettant de simuler une plaie sur des cultures monocouches de kératinocytes (lignée HaCaT). Dans le second cas, des plaies sont effectuées, généralement sur des rongeurs. Après mise en contact de la plaie avec les échantillons à tester, la cicatrisation est observée au cours du temps.

L'activité cicatrisante de l'acide usnique a été mise en évidence *in vitro* par « scratch test » (Burlando *et al.*, 2009). Appliqué à des doses non cytotoxiques, celui-ci stimule la prolifération ainsi que la migration des kératinocytes, et son activité est améliorée lorsqu'il est utilisé en combinaison avec un autre métabolite lichénique secondaire, l'acide gyrophorique. De plus, une étude *in vivo* sur l'utilisation de films de collagène dans le cas de brûlures a mis en exergue une cicatrisation plus rapide pour les films contenant de l'acide usnique encapsulé dans des liposomes (Nunes *et al.*, 2011). Plus récemment, des tests *in vitro* et *in vivo* ont démontré des propriétés cicatrisantes remarquables ainsi qu'une faible cytotoxicité pour des dérivés d'acide usnique (énamines) (Bruno *et al.*, 2013a).

II.4.2.3.f. Activités analgésique et antipyrétique

A notre connaissance, très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les activités analgésique et antipyrétique de l'acide usnique. Néanmoins, une étude *in vivo*, par traitement oral sur des souris, a mis en évidence ce type d'activités pour les acides usnique et diffractaique isolés du lichen *Usnea diffracta* (Okuyama *et al.*, 1995).

L'acide usnique possède donc des activités biologiques variées, notamment des propriétés antimicrobienne et antioxydante, qui en font un candidat potentiel pour une utilisation en tant qu'agent de conservation, en particulier dans le domaine de la cosmétique.

II.4.3. Utilisation de l'acide usnique dans l'industrie cosmétique

La stabilité microbiologique des produits cosmétiques est une préoccupation majeure afin d'assurer la conservation de leurs caractères organoleptiques et leur innocuité. L'utilisation d'agents conservateurs permet de prévenir l'altération microbiologique et de prolonger la date d'expiration du produit, mais aussi de protéger le consommateur contre d'éventuelles infections.

Actuellement, de nombreux conservateurs sont autorisés dans les produits cosmétiques dont le triclosan, le phénoxyéthanol ou encore les parabènes (liste des conservateurs autorisés en Europe, voir annexe 1). Afin d'avoir un large spectre d'activité antimicrobienne, ces composés forment couramment des cocktails de conservateurs utilisés par les industriels. C'est par exemple le cas du Phénonip® (Clariant), du Nipaguard® BPX (Clariant) ou encore de l'Euxyl® K702 (Schülke & Mayr GmbH) (Tableau 2).

Tableau 2 : Composition de quelques cocktails de conservateurs utilisés dans l'industrie cosmétique.

Produit	Composition
Phénonip®	Phénoxyéthanol, méthyl-, éthyl-, butyl-, propyl- et isobutylparabènes
Nipaguard® BPX	Phénoxyéthanol, éthyl- et propylparabènes, 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol
Euxyl® K702	Phénoxyéthanol, acide benzoïque, acide déhydroacétique, eau, éthylhexylglycérine, polyaminopropyl biguanide

Les parabènes, à l'origine développés pour se substituer au formaldéhyde, sont régulièrement au cœur de polémiques les suspectant notamment d'augmenter les risques de développement de cancers (Tavares *et al.*, 2009 ; Vo *et al.*, 2011). Bien que le lien entre parabènes et cancer du sein n'ait pas été prouvé et qu'ils soient peu allergènes, ces conservateurs sont néanmoins devenus très impopulaires. De plus, la tendance sociétale est aux produits naturels et/ou Bio avec une demande croissante. Ces différents facteurs ont donc poussé, ces dernières années, les industries cosmétiques à développer des substituts aux très médiatisés parabènes. Ainsi, des huiles essentielles ou des extraits de végétaux sont utilisés comme agents conservateurs alternatifs (Varvaresou *et al.*, 2009). C'est dans cette dynamique de recherche que les lichens, et notamment l'acide usnique, suscitent un intérêt particulier.

Usnea barbata (ou barbe de Jupiter) est un lichen répandu, et bien qu'il ne soit pas le plus riche en acide (+)-usnique, il constitue la principale source pour la production industrielle et la commercialisation de ce composé (Variati, 2010). L'extrait d'*Usnea barbata*, du fait de ses activités antimicrobienne et antioxydante, entre dans la composition de produits tels que des crèmes solaires, sérums, gels nettoyants, shampoings antipelliculaires, dentifrices ou encore gels douche, y compris dans des produits Bio certifiés Ecocert (Figure 51).



Figure 51 : Produits cosmétiques contenant l'extrait d'*U. barbata*, de gauche à droite : crème solaire de Centella, sérum purifiant de Sothys, shampoing antipelliculaire Bio de Cattier, gel nettoyant de Guinot, dentifrice Bio de vegetoCARYL et gel douche Bio de Druide.

Si l'acide usnique trouve des applications intéressantes, sa faible solubilité dans les solvants couramment employés en formulation (eau, éthanol, éthoxydiglycol, glycérine, propylène glycol) constitue néanmoins un frein à son utilisation. Une manière d'améliorer la solubilité de l'acide usnique est de l'incorporer à pH basique, voisin de 8, en présence de triéthanolamine. Cette méthode a été publiée dans un brevet déposé en 1995 par la compagnie Gillette pour la formulation d'un déodorant en stick contenant de l'acide usnique. Une autre possibilité a été envisagée par l'équipe de Variati ; il s'agit de salifier l'acide usnique par des sels de sodium afin d'obtenir un composé nouveau, l'usnéate de sodium, possédant une activité antimicrobienne similaire mais une meilleure solubilité dans les solvants cosmétiques (Figure 52) (Variati, 2010). Ce composé est enregistré sous la marque déposée Evosina® et fait partie de la liste des ingrédients certifiés Ecocert.

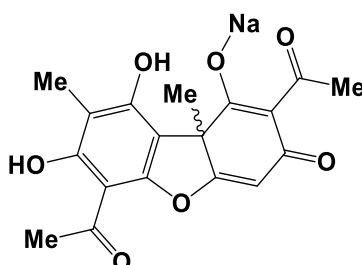


Figure 52 : Structure de l'usnéate de sodium (Evosina®).

L'usnéate de sodium Evosina® peut être intégré dans des spécialités anti-acné, nettoyants pour le visage, déodorants ou encore shampooings antipelliculaires (dosage compris entre 0,01 et 0,05 %) (Figure 53).



Figure 53 : Produits cosmétiques contenant Evosina® : déodorant de Ringana et soins Pedicare de Ericson Laboratoire.

Un autre sel d'acide usnique a été développé par le même groupe de recherche : l'usnéate de cuivre (Figure 54), déposé sous le nom de Biostat Polvere®, qui a démontré une activité antibactérienne similaire à celle de l'acide usnique mais une activité supérieure vis-à-vis de souches fongiques (*Tinea pedis* par exemple).

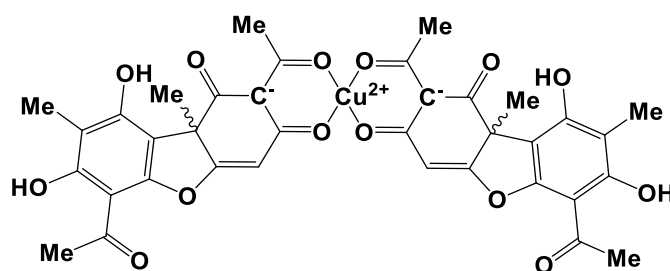


Figure 54 : Structure de l'usnéate de cuivre (Biostat Polvere®).

Cependant, l'acide usnique et ses sels, en utilisation non diluée, possèdent un certain degré de toxicité, et en particulier un potentiel allergisant (Aalto-Korte *et al.*, 2005), qui devient négligeable lorsque ces ingrédients sont incorporés à leur dosage d'efficacité dans les spécialités (en moyenne 0,02 %). Evosina® et Biostat Polvere® sont donc considérés comme étant non-irritants et non-sensibilisants.

La société Flavex commercialise un ingrédient cosmétique contenant 4 % d'acide usnique ; il s'agit d'un extrait d'*U. barbata* obtenu par extraction en fluide supercritique de dioxyde de carbone, dispersible dans l'eau, et formulé dans de l'huile de tournesol et un mélange d'émulsifiants. Un des avantages revendiqués par le fournisseur est la méthode d'extraction qui garantit l'absence de résidus de solvants, sels inorganiques et métaux lourds.

II.4.4. Autres utilisations

L'extrait d'*U. barbata*, riche en acide usnique, est également retrouvé comme constituant principal de granules homéopathiques (dilutions entre 3 CH et 30 CH) et de compléments alimentaires sous forme de gouttes contre la fièvre ou comme stimulant des défenses immunitaires (Figure 55).



Figure 55 : De gauche à droite : granules homéopathiques de Boiron, compléments alimentaires de Herbamed et d'Eclectic Institute.

Aux Etats-Unis, des extraits bruts d'acide usnique ou l'acide usnique pur ont été utilisés dans des compléments alimentaires destinés à la perte de poids. Un produit en particulier, le LipoKinetix®, contenant entre autres de l'acide usnique, de la noréphédrine et de la caféine, a été commercialisé puis interdit à la vente en raison de plusieurs cas d'hépatotoxicité sévère (Sanchez *et al.*, 2006). Suite à cette affaire, des études menées sur des rats et des souris au National Center for Toxicological Research (Etats-Unis) ont attesté que les préparations à base d'extrait d'*Usnea* sp. contenant des concentrations équivalentes en acide usnique ont une hépatotoxicité plus élevée que l'acide usnique pur (Guo *et al.*, 2008). Au milieu du 20^{ème} siècle, l'acide usnique a également été utilisé en tant qu'antibiotique (Binan® et Usno® par exemple) (Boustie *et al.*, 2011).

Objectif du travail

Ainsi qu'en témoigne l'étude bibliographique, les lichens sont une source de métabolites originaux, d'une grande diversité structurale et possédant des activités biologiques variées, conférant notamment aux lichens la capacité de résister à des conditions environnementales extrêmes.

L'acide usnique est l'un des métabolites lichéniques fréquemment décrits dans la littérature. Ses propriétés biologiques, notamment son pouvoir antimicrobien, ont fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, l'acide usnique, extrait de lichens du genre *Usnea*, est employé comme agent de conservation dans certains produits cosmétiques. Néanmoins, sa potentielle allergénicité, sa faible solubilité dans les solvants usuels ainsi que sa coloration jaune vive peuvent limiter son utilisation dans ce domaine. D'ailleurs, et s'agissant d'un extrait naturel, l'allergénicité parfois observée a-t-elle pour origine l'acide usnique lui-même ou les impuretés qui peuvent contaminer les extraits ?

Tous deux intéressés par la valorisation chimique et biologique des agro-ressources, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles d'une part, et la société Sothys International et sa filiale "Les jardins Sothys" d'autre part, ont décidé d'engager cette étude prospective dédiée aux lichens. L'étude phytochimique a été réalisée sur trois espèces de lichen récoltées en Limousin.

Toutefois, une croissance lente tout comme les faibles teneurs en métabolites secondaires bioactifs isolés, rendent la généralisation de l'exploitation des lichens à une échelle industrielle délicate voire impossible. C'est la raison pour laquelle il convient de concevoir puis de mettre en œuvre des stratégies de synthèse des composés lichéniques afin d'une part, de préserver l'équilibre écologique, et d'autre part, de produire les composés d'intérêt en quantité suffisante pour caractériser leurs activités biologiques et les valoriser ultérieurement. En outre, la pureté associée à l'obtention par voie de synthèse chimique des métabolites secondaires pourrait supprimer les risques d'allergénicité liés aux contaminants souvent présents dans les extraits naturels. Enfin, la synthèse de molécules extraites, en particulier celles nouvellement décrites, contribuent très souvent à en valider l'identification structurale.

Dans ce contexte, notre travail a consisté à rechercher des molécules lichéniques qui, à l'instar de l'acide usnique, possèdent des activités antimicrobiennes permettant d'envisager leur usage en tant que conservateurs pour l'industrie cosmétique. Cette étude a été menée selon un objectif double :

- D'une part, identifier des composés lichéniques bioactifs à partir de trois espèces régionales : *Usnea florida*, *Flavoparmelia caperata* et *Cladonia incrassata*. La démarche adoptée a consisté, après caractérisation de leurs activités antimicrobiennes, à effectuer un fractionnement bioguidé des extraits. L'effet des composés isolés sur la croissance de *Staphylococcus aureus* a également été déterminé et comparé à celui d'un conservateur de référence, le Phénonip®.
- D'autre part, proposer des approches synthétiques pour l'acide usnique et la cladoxanthone A, avec des finalités distinctes :
 - ✓ Dans le cas de l'acide usnique et afin de s'affranchir de l'utilisation d'extraits, optimiser la préparation du précurseur et développer une méthode de couplage innovante assistée par un catalyseur de type porphyrine.
 - ✓ Dans le cas de la cladoxanthone A, valider son identification structurale et obtenir une masse suffisante permettant d'approfondir les tests d'activité biologique.

PARTIE B

ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DE TROIS ESPÈCES DE LICHEN - ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS & DES MÉTABOLITES ISOLÉS



Partie B. Etude phytochimique de trois espèces de lichen - Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits et des métabolites isolés

L'acide usnique est un métabolite lichénique intéressant au vue des nombreuses propriétés biologiques qu'il possède. Son activité antibactérienne permet notamment son usage en tant qu'agent de conservation dans les produits cosmétiques.

Cependant, sa faible solubilité dans les solvants classiquement utilisés en formulation et son potentiel allergisant constituent des limites à son emploi. En effet, alors que l'acide (-)-usnique ne semble produire aucune dermatite de contact, l'acide (+)-usnique, le plus couramment retrouvé chez les lichens et employé dans certains produits de soin, provoque des réactions cutanées suite à son application par patch test (Mitchell, 1966 ; Mitchell et Shibata, 1969). Enfin, bien qu'utilisé à faible concentration dans les préparations, sa couleur jaune vive peut poser des problèmes quant à la teinte finale du produit.

L'objectif premier de ce travail était donc d'extraire, isoler et identifier d'une part l'acide usnique, et d'autre part, des composés de structure proche, qui présenteraient des propriétés biologiques similaires (notamment une activité antimicrobienne), mais une meilleure solubilité et un caractère non allergène. Au vue de la littérature, de nombreuses espèces de lichen des genres *Usnea*, *Cladonia* et *Parmelia* contiennent de l'acide usnique (Ingólfssdóttir, 2002). De plus, des dibenzofuranes, composés de structure proche de l'acide usnique, sont décrits chez certains *Cladonia*, ce qui en fait un genre de choix pour notre étude (Culberson *et al.*, 1982 ; Ahti, 2000).

I. CHOIX DES ESPECES

Selon les données disponibles dans les fiches de l'inventaire ZNIEFF (Zone Naturelle d'Intérêt Ecologique, Faunistique et Floristique) concernant la répartition des lichens en Limousin, divers sites de récolte ont été sélectionnés. Plusieurs excursions ont été organisées afin de procéder à un échantillonnage des espèces de lichens des genres *Usnea*, *Parmelia* et principalement *Cladonia*, présentes sur chaque site.

I.1. Récolte et identification des lichens

Selon les espèces, les lichens ont été ramassés sur des vieilles souches de chênes et/ou de châtaigniers, des rochers, des troncs d'arbres ou encore sur le sol. Au total, 17 espèces appartenant aux genres *Cladonia* (dont certaines espèces portent des apothécies rouges ou marron), *Usnea* et *Flavoparmelia* ont été échantillonnées, nettoyées et séchées à l'air ambiant pendant quelques jours. Pour la majorité des espèces de *Cladonia*, une faible biomasse a été ramassée du fait de leur présence assez rare sur les lieux de récolte et afin d'en préserver l'équilibre écologique.

Etant donné les difficultés liées à l'identification des lichens, deux approches ont été mises en œuvre : des observations macroscopiques d'une part, ainsi que des réactions thallines, d'autre part.

Les caractéristiques concernant l'aspect morphologique général de chaque espèce ont donc été notées, en particulier le type de thalle et la présence d'apothécies. Parallèlement aux réactions thallines, les lichens ont été observés sous lumière UV (254 nm). Selon les composés majoritaires dans les lichens, la présence ou l'absence d'une fluorescence blanche peut être notée (UV+ blanc ou UV-).

La Figure 56 illustre chacune des espèces récoltées lors des différentes excursions. Les numéros correspondent à ceux indiqués dans le Tableau 3, qui récapitule les noms ainsi que les principales caractéristiques de chaque espèce.

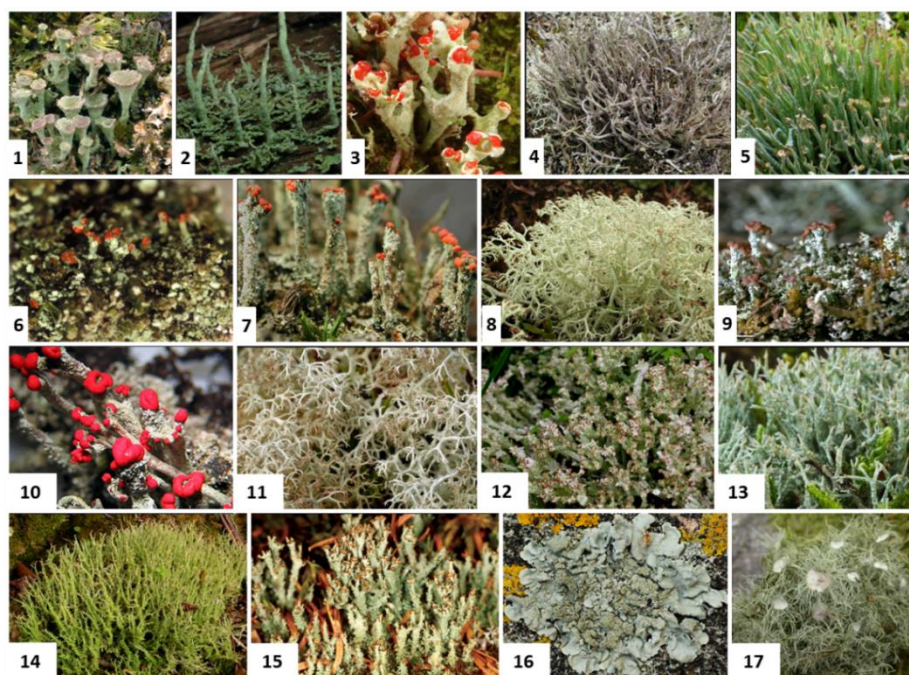


Figure 56 : Illustration des 17 espèces de lichen récoltées.

Tableau 3 : Bilan des espèces récoltées et de leurs caractéristiques.

Espèce	Lichen	Type de thalle	K	C	KC	Pd	UV
<i>C. chlorophaea</i>	1	Complexe	-	-	-	+ orange	+ blanc
<i>C. coniocraea</i>	2		+ jaune	-	-	+ rouge	-
<i>C. digitata</i>	3		+ jaune	-	-	+ jaune-orange	-
<i>C. glauca</i>	4		-	-	-	-	-
<i>C. gracilis</i>	5		± jaune	-	-	+ rouge	-
<i>C. incrassata</i>	6		-	-	+ jaune	-	+ blanc
<i>C. macilenta</i>	7		+ jaune	-	-	± orange	-
<i>C. mitis</i>	8		-	-	± jaune	-	-
<i>C. parasitica</i>	9		+ jaune	-	-	+ orange	-
<i>C. polydactyla</i>	10		± jaune	-	-	+ orange	-
<i>C. portentosa</i>	11		-	-	-	-	± blanc
<i>C. ramulosa</i>	12		-	-	-	+ rouge-orangé	-
<i>C. rangiformis</i>	13		-	-	-	± rouge	-
<i>C. scabriuscula</i>	14		+ brun	-	-	+ rouge	-
<i>C. squamosa</i>	15		-	-	-	-	+ blanc
<i>F. caperata</i>	16	Foliacé	± jaune	-	± rouge	+ rouge-orangé	-
<i>U. florida</i>	17	Fruticuleux	+ jaune	-	-	+ rouge-orangé	-

Afin de sélectionner les lichens d'intérêt pour les études phytochimiques, le contenu en métabolites secondaires des espèces récoltées a été évalué. Dans ce but, la méthode envisagée a été de comparer les profils chimiques des extraits produits pour chaque échantillon de lichen. Cependant, les métabolites secondaires peuvent être extraits selon différentes techniques et avec des solvants variés ; la première étape a donc consisté à choisir le solvant et la méthode d'extraction.

I.2. Choix du solvant et du type d'extraction

Afin de déterminer le solvant d'extraction adéquat, différents essais ont été effectués sur certaines espèces de lichen et en présence de différents solvants, en procédant soit à des extractions classiques (avec un seul solvant), soit à des extractions séquentielles (solvants de polarité croissante).

I.2.1. Extractions classiques

Selon la littérature, l'acétone est classiquement utilisé pour l'extraction des métabolites secondaires lichéniques et peut être effectuée à température ambiante pendant plusieurs heures (Vila

et al., 2011) ou encore à chaud (Din *et al.*, 2010). Le chloroforme (Polovinka *et al.*, 2012) et l'éther diéthylique (Culberson *et al.*, 1982) figurent également parmi les solvants utilisés. Dans le cadre de ce travail, le choix de réaliser les extractions à température ambiante a été fait, dans le but d'éviter la dégradation potentielle de certains composés (notamment des depsides, sensibles à la chaleur).

Des essais d'extraction par l'acétone, le chloroforme et l'éther diéthylique, ont donc été mis en œuvre sur deux *Cladonia* parmi les espèces récoltées : *C. portentosa* et *C. rangiformis*, dont les biomasses disponibles étaient importantes (100 et 50 grammes respectivement) (Figure 57).



Figure 57 : Morphologie générale des lichens *C. portentosa* (à gauche) et *C. rangiformis* (à droite).

La Figure 58 ci-après présente les pourcentages d'extraction obtenus. Pour les deux espèces, l'extraction par l'acétone permet d'augmenter significativement les rendements massiques par rapport au chloroforme et à l'éther diéthylique, pour lesquels les pourcentages d'extraction sont proches. Cela est particulièrement notable dans le cas de *C. rangiformis*, avec un pourcentage d'extraction plus de 7 fois supérieur avec l'acétone (2,9 %), comparé aux deux autres solvants.

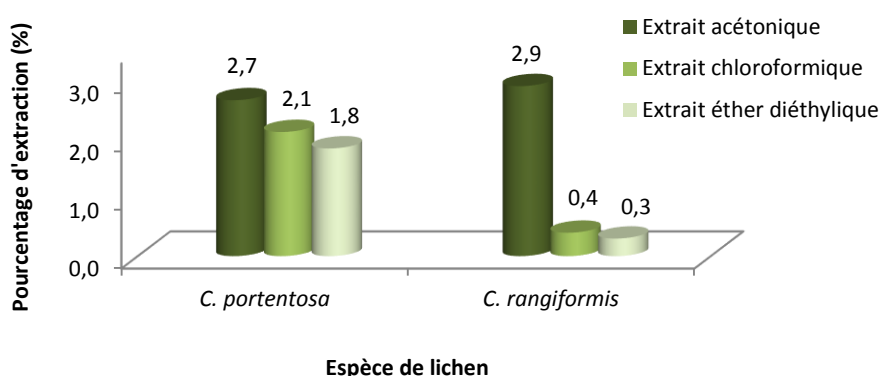


Figure 58 : Pourcentages d'extraction obtenus en présence d'acétone, de chloroforme et d'éther diéthylique.

L'analyse des profils chimiques des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM) met en évidence, pour une même espèce, des compositions en métabolites secondaires similaires quel que soit le solvant utilisé (Figure 59). Cependant, l'acétone permet d'extraire des composés supplémentaires par rapport aux deux autres solvants (spots pointés par les flèches).

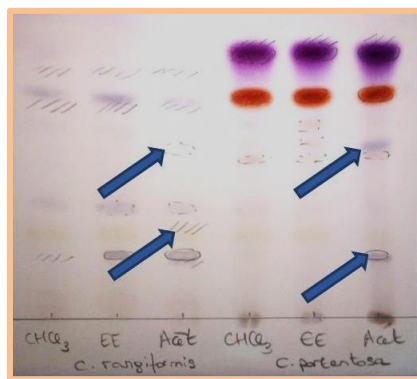


Figure 59 : Analyse par CCM des extraits de *C. portentosa* et *C. rangiformis*. De gauche à droite : extraits de *C. rangiformis* : chloroformique, éther diéthylique et acétonique ; extraits de *C. portentosa* : chloroformique, éther diéthylique et acétonique. Eluant : toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5 (v/v/v). Observation sous UV (254 et 365 nm), puis révélation par l'anisaldéhyde sulfurique.

De même, les colorations des extraits en solution (pour une même concentration) sont semblables pour le chloroforme et l'éther diéthylique, tandis que l'extrait acétonique est, dans les deux cas, de couleur plus soutenue. Cela laisse donc supposer que l'acétone permet d'extraire des composés non récupérés avec le chloroforme ou l'éther diéthylique, et qui ne sont pas nécessairement révélés par la solution d'anisaldéhyde sulfurique (ANS) (Figure 60).

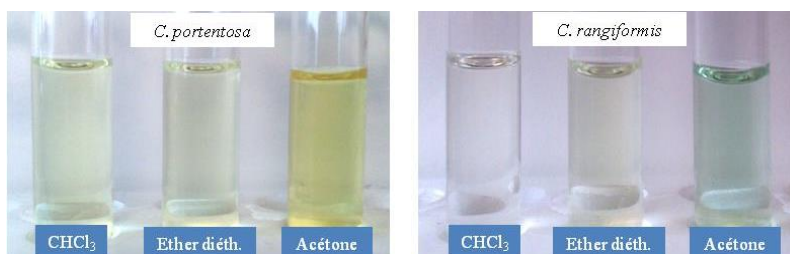


Figure 60 : Coloration des extraits en solution obtenus avec le chloroforme, l'éther diéthylique et l'acétone.

D'après ces résultats préliminaires, l'acétone s'avère être le solvant le plus approprié. En effet, si les trois solvants utilisés permettent l'obtention d'extraits avec des profils chimiques similaires, l'acétone conduit à un pourcentage d'extraction bien supérieur au chloroforme et à l'éther diéthylique, et semble extraire une plus large gamme de composés.

Dans un second temps, des extractions successives utilisant des solvants de polarité croissante ont été effectuées. En effet, la mise en place d'un gradient de polarité permet généralement de réaliser une extraction plus sélective.

I.2.2. Extractions séquentielles

Selon la littérature, différentes séries d'extractions peuvent être réalisées en présence d'heptane, hexane, toluène, éther diéthylique, dichlorométhane, tétrahydrofurane, acétone, acétate d'éthyle, ou de méthanol (Verma *et al.*, 2011 ; Millot *et al.*, 2012).

Dans ce travail, des extractions séquentielles, utilisant le *n*-hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, le méthanol et l'eau chaude (60°C), ont été mises en œuvre sur *Cladonia portentosa* et sur *Flavoparmelia caperata*. Etant donné qu'il s'agit d'extractions successives, les essais ont été effectués sur une masse de lichen plus importante. Les extractions ont été conduites à température ambiante (sauf pour l'extraction par l'eau). Pour chaque solvant, les macérations sont renouvelées jusqu'à épuisement (obtention d'un filtrat incolore) (Figure 61). En parallèle, une extraction classique par l'acétone a été réalisée afin de comparer les rendements massiques ainsi que les profils chimiques des extraits obtenus par les deux méthodes.

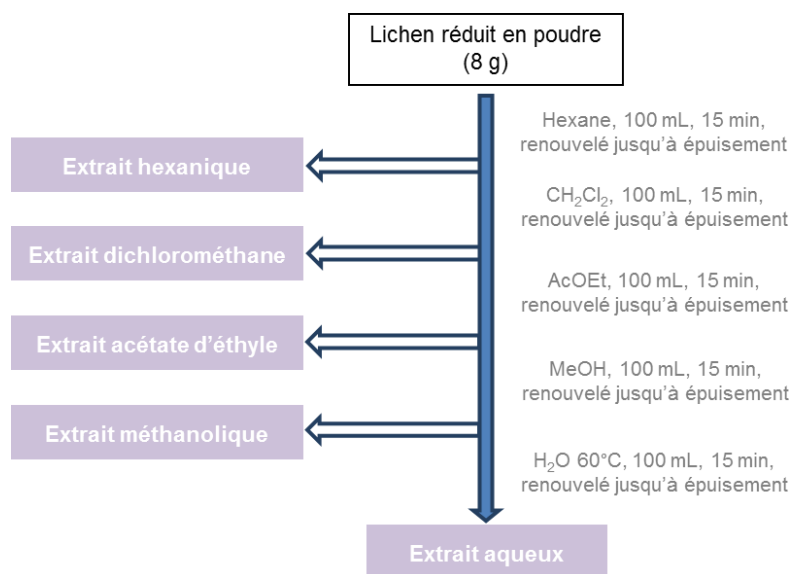


Figure 61 : Schéma des extractions successives sur *C. portentosa* et *F. caperata*.

Les rendements massiques des extraits obtenus par extractions successives et par extraction classique à l'acétone sont présentés sur la Figure 62.

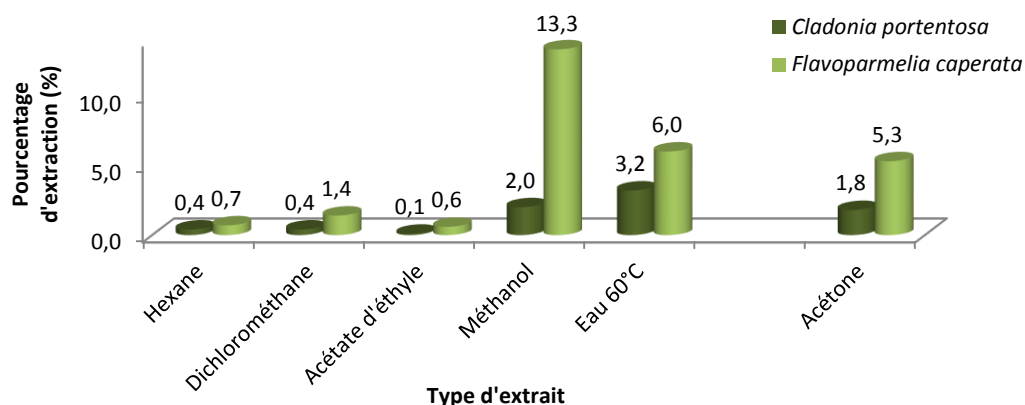


Figure 62 : Rendements massiques obtenus pour l'extraction séquentielle par l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'eau chaude (60°C), et pour l'extraction classique par l'acétone.

D'une manière générale, quels que soient le solvant et le type d'extraction, les rendements massiques les plus élevés sont obtenus pour *Flavoparmelia caperata*, ce qui suggère que cette espèce renferme une plus grande quantité de composés polaires et apolaires que *Cladonia portentosa*.

Pour les deux espèces, les rendements massiques les plus faibles sont obtenus avec les solvants apolaires (hexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle), et les plus élevés avec le méthanol et l'eau ; cela suppose que les deux lichens contiennent plus de composés polaires que de composés apolaires. Ceci est particulièrement notable pour l'extrait méthanolique de *F. caperata* obtenu avec un rendement plus de deux fois supérieur à celui de *C. portentosa* (13,3 % contre 6,0 %).

Les profils chimiques des extraits des deux espèces ont ensuite été comparés par analyse sur chromatographie sur couche mince (Figure 63).

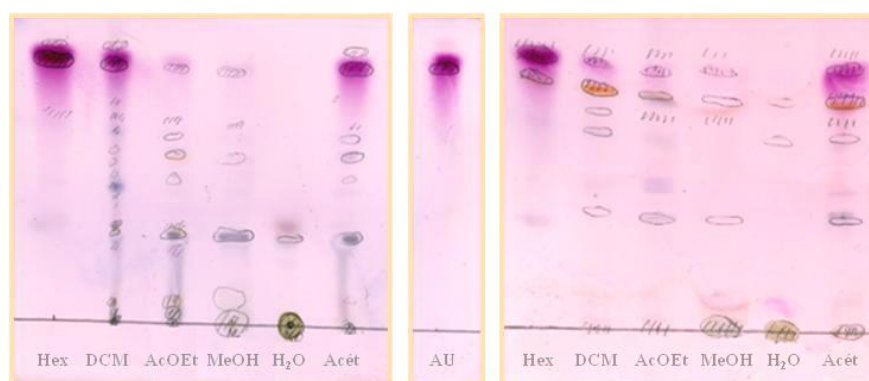


Figure 63 : CCM récapitulatives pour les extraits de *F. caperata* (à gauche) et *C. portentosa* (à droite). Hex : extrait hexanique ; DCM : extrait dichlorométhane ; AcOEt : extrait acétate d'éthyle ; MeOH : extrait méthanolique ; H₂O : extrait aqueux (60°C) ; Acét : extrait acétonique ; AU : acide usnique (témoin). Eluant : toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5 (v/v/v). Observation sous UV (254 et 365 nm), puis révélation par l'anisaldéhyde sulfurique.

Concernant les extractions successives et pour les deux espèces étudiées, l'extrait hexanique semble contenir essentiellement de l'acide usnique dont la présence diminue avec l'augmentation de polarité des solvants utilisés. L'hexane permet donc d'entraîner la majeure partie de l'acide usnique présent dans les lichens, mais ne permet pas de l'éliminer totalement. Les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol montrent la présence de composés de polarités diverses (polaires à apolaires) tandis que l'extrait aqueux contient principalement des composés très polaires n'ayant pas migré, potentiellement des sucres (coloration verte caractéristique après révélation par l'ANS).

Enfin, les extraits acétoniques semblent contenir les mêmes composés que ceux présents dans les autres extraits. L'extraction par l'acétone permet donc d'obtenir un extrait global, renfermant des composés de polarités très différentes (polaires à apolaires), tout en limitant l'extraction des sucres (métabolites non recherchés dans cette étude).

I.2.3. Choix de la méthode d'extraction

Dans le cadre de ce travail, le choix d'effectuer sur les lichens une extraction classique par l'acétone, à température ambiante a été fait. L'utilisation d'acétone qui est un solvant moyennement apolaire, permettra d'une part, de produire des extraits bruts contenant des composés avec une large gamme de polarités, et d'autre part, d'obtenir des pourcentages d'extraction supérieurs au chloroforme et à l'éther diéthylique. Enfin, l'extraction à température ambiante a pour but de préserver l'intégrité des molécules et d'en éviter la dégradation.

I.3. Extractions par l'acétone

Pour chacun des 17 échantillons récoltés, l'extraction par l'acétone a donc été conduite à température ambiante sur les lichens réduits en poudre.

I.3.1. Comparaison des pourcentages d'extraction

Après séchage des extraits, les rendements massiques obtenus pour les différentes espèces sont calculés (Figure 64). Selon les espèces, les rendements varient entre 1,2 % pour *Cladonia ramulosa* et 6,2 % pour *Flavoparmelia caperata*. D'une manière générale, ces rendements s'avèrent plus élevés pour *Flavoparmelia caperata* et *Usnea florida* que pour les différentes espèces de *Cladonia*.

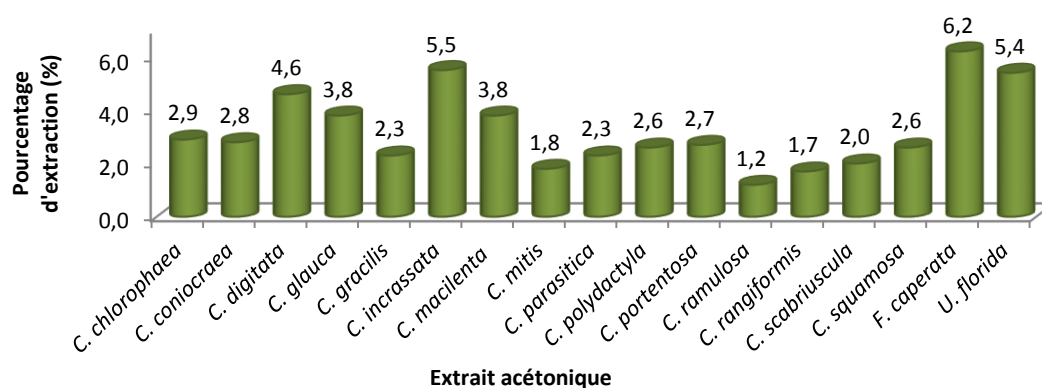


Figure 64 : Bilan des pourcentages d'extraction obtenus pour les différentes espèces de lichen récoltées.

Au sein même du genre *Cladonia*, les pourcentages d'extraction sont en moyenne de 2,8 %. Quelques espèces se distinguent avec des pourcentages plus élevés tels que *C. digitata* (4,6 %), *C. glauca* (3,8 %), *C. macilenta* (3,8 %), et en particulier *C. incrassata* avec un rendement massique de 5,5 % environ deux fois supérieur à la moyenne et similaire à celui obtenu pour *U. florida*. En termes de pourcentages d'extraction, une première tendance semble donc se dégager avec les résultats les plus intéressants pour les lichens suivants : *Cladonia incrassata* (5,5 %), *Usnea florida* (5,4 %) et *Flavoparmelia caperata* (6,2 %).

I.3.2. Comparaison des profils chimiques

Les profils chimiques des extraits ont ensuite été comparés par CCM. Le chromatogramme a été observé sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélé par l'anisaldéhyde sulfurique (Figure 65). L'acide (+)-usnique commercial a ici été déposé comme témoin.

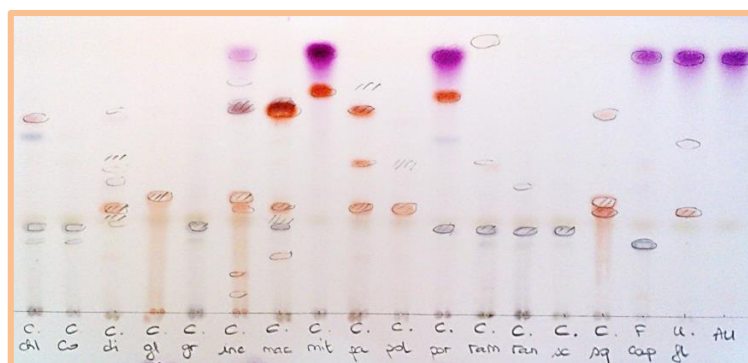


Figure 65 : Analyse comparative par CCM des profils chimiques des extraits. Eluant : toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5 (v/v/v), puis observation sous UV (254 et 365 nm) et révélation par l'ANS. De gauche à droite, extraits acétoniques de : *C. chlorophaea*, *C. coniocraea*, *C. digitata*, *C. glauca*, *C. gracilis*, *C. incrassata*, *C. macilenta*, *C. mitis*, *C. parasitica*, *C. polydactyla*, *C. portentosa*, *C. ramulosa*, *C. rangiformis*, *C. scabriuscula*, *C. squamosa*, *F. caperata* et *U. florida*. AU : acide (+)-usnique commercial.

L'analyse des profils chimiques a été effectuée en tenant compte de deux critères principaux : d'une part, la présence d'acide usnique, et d'autre part, la diversité des métabolites secondaires constituant chaque extrait. De plus, la révélation par l'ANS permet de visualiser et de distinguer différentes familles de métabolites secondaires. Ainsi, l'acide usnique a tendance à se révéler en violet, les dibenzofuranes en mauve et les depsides en orange.

Si les extraits acétoniques des lichens *U. florida* et *F. caperata* semblent contenir majoritairement de l'acide usnique, la présence de ce composé chez les espèces de *Cladonia* n'est pas homogène. En effet, l'acide usnique est absent (ou faiblement présent) de la majorité des extraits de *Cladonia*, par exemple chez les espèces *C. digitata*, *C. polydactyla*, *C. macilenta*, ou encore *C. squamosa*, dont les extraits contiennent pour la plupart des composés révélés en orange et/ou en gris-bleu par l'ANS. En revanche, dans certains extraits tels que ceux de *C. portentosa* et *C. mitis*, la présence de deux métabolites majoritaires, l'acide usnique et un autre composé (révélé en orange), est mise en évidence. De même, l'extrait de *C. incrassata* se démarque par la présence d'acide usnique et par la diversité des composés observés. Comparé à la plupart des extraits, qui contiennent une ou deux molécules majoritaires, une plus grande variété de métabolites est mise en évidence pour l'extrait de *C. incrassata*. Aussi, les colorations observées après révélation par l'ANS soulignent la présence probable de dibenzofuranes (coloration mauve) notamment dans l'extrait de *C. incrassata* et de depsides (coloration orange).

I.4. Description des espèces sélectionnées

Selon les résultats précédents, la sélection des lichens pour la suite du travail a tenu compte des critères suivants :

- La masse sèche disponible, sachant qu'il s'agit de perturber le moins possible l'équilibre écologique sur les sites de récolte ;
- Le rendement massique obtenu après extraction acétonique ;
- La présence d'acide usnique dans l'extrait ;
- Le profil chimique, reflétant la diversité des métabolites présents dans l'extrait.

L'analyse croisée des extraits acétoniques selon ces quatre critères nous a conduits à sélectionner trois espèces d'intérêt pour les études phytochimiques : *C. incrassata*, *U. florida*, et *F. caperata* (Tableau 4). Ces trois lichens sont un bon compromis entre la présence d'acide usnique, la quantité récoltée, le pourcentage d'extraction et la diversité chimique observée par analyse en CCM.

De même, les données de la littérature ont été prises en compte. Les lichens *U. florida* et *F. caperata* sont des espèces assez communes dont la récolte ne menace pas la biodiversité alors que

Cladonia incrassata est un lichen beaucoup plus rare mais pour lequel une quantité acceptable a été récoltée. Ce dernier s'avère donc d'autant plus intéressant qu'il est peu étudié.

Tableau 4 : Choix des espèces pour les études phytochimiques : analyse croisée des extraits acétoniques.

Espèce	Quantité récoltée (g)	Rendement d'extraction (%)	Présence d'acide usnique	Profil chimique (CCM)
<i>C. chlorophaea</i>	5	2,9	-	4 spots
<i>C. coniocraea</i>	< 10	2,8	-	2 spots
<i>C. digitata</i>	< 10	4,6	-	7 spots
<i>C. glauca</i>	< 10	3,8	-	1 spot
<i>C. gracilis</i>	< 10	2,3	-	1 spot
<i>C. incrassata</i>	20	5,5	+	8 spots
<i>C. macilenta</i>	< 10	3,8	-	5 spots
<i>C. mitis</i>	< 10	1,8	+	2 spots
<i>C. parasitica</i>	30	2,3	-	4 spots
<i>C. polydactyla</i>	< 10	2,6	-	2 spots
<i>C. portentosa</i>	100	2,7	+	4 spots
<i>C. ramulosa</i>	< 10	1,2	-	3 spots
<i>C. rangiformis</i>	> 100	1,7	-	2 spots
<i>C. scabriuscula</i>	10	2,0	-	1 spot
<i>C. squamosa</i>	100	2,6	-	3 spots
<i>F. caperata</i>	40	6,2	+	2 spots
<i>U. florida</i>	100	5,4	+	3 spots

Chez les trois lichens sélectionnés pour les études phytochimiques, le photobionte est une algue verte du genre *Trebouxia* et les espèces appartiennent toutes, du règne jusqu'à l'ordre, à la classification présentée ci-dessous :

- Règne : Fungi
- Division : Ascomycota
- Sous-embranchement : Pezizomycotina
- Classe : Lecanoromycètes
- Sous-classe : Lecanoromycetidae
- Ordre : Lecanorales

Pour *C. incrassata*, quatre sous-espèces et variétés sont référencées alors que plusieurs dizaines et une dizaine sont reportées respectivement pour *U. florida* et *F. caperata*.

1.4.1. *Cladonia incrassata* Flörke

La récolte a été effectuée sur l'écorce d'une vieille souche de châtaignier, exposée mi-ombre (Figure 66). Ce lichen, appartenant à la famille des Cladoniaceae, est rare en France où il n'est guère connu que dans l'Ouest, le Centre, les Pyrénées et en Bretagne. Il se retrouve sur les sols tourbeux, l'humus, les débris végétaux, ou encore les vieilles souches d'arbre (Ozenda et Clauzade 1970 ; Dobson, 2005). Ce taxon n'est pas protégé en Limousin mais sa cueillette est réglementée en Loire-Atlantique.



Figure 66 : Lieu de récolte de *Cladonia incrassata* dans la forêt des Vaseix (Verneuil-sur-Vienne, 87).

Il s'agit d'un thalle complexe formé d'un thalle primaire squamuleux peu étalé sur le substrat (la face supérieure des squames est jaunâtre), ainsi que d'un thalle secondaire fruticuleux, formé de podétions courts (entre 0,5 et 1,5 mm de haut) peu squamuleux, ramifiés et verruqueux. Ils sont épaissis au sommet et portent de minuscules apothécies rouges (de 0,5 à 1 mm) (Figure 67).



Figure 67 : Aspect général du lichen *Cladonia incrassata*. Morphologie de plusieurs spécimens dont les podétions ramifiés (hauteur 0,5-1,5 cm) et les apothécies (hauteur 0,5-1 mm) sont bien visibles.

Cette espèce est relativement rare donc peu étudiée. Cependant, pour des échantillons récoltés en Pologne, deux chémotypes sont reportés dans la littérature : les spécimens contenant les acides didymique, squamatique et usnique, et les spécimens contenant les acides didymique et squamatique (Kukwa, 2005). Les acides barbatique, thamnolique, subdidymique et condidymique ont également été

détectés par chromatographie liquide haute performance (Huovinen *et al.*, 1989 ; Kortepeter, 1996 ; Hauck *et al.*, 2009a). La Figure 68 présente les structures de certains des métabolites décrits.

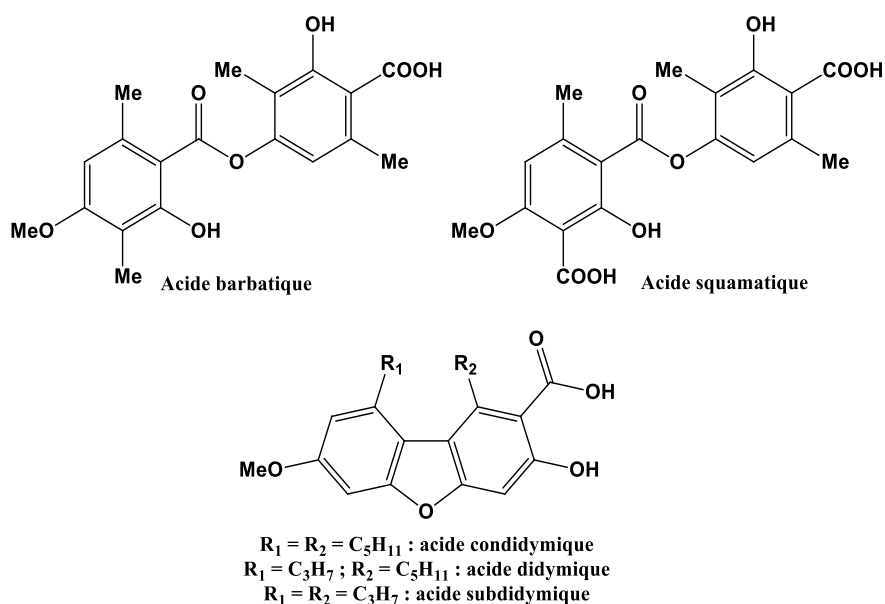


Figure 68 : Structures des composés identifiés chez *C. incrassata*, outre l'acide usnique.

1.4.2. *Usnea florida* (L.) Weber ex F.H. Wigg.

Les échantillons de ce lichen ont été récoltés dans une forêt semi-ombragée sur des branches de chêne tombées au sol (Figure 69). *U. florida* appartient à la famille des Parmeliaceae. Le thalle est fruticuleux, plus ou moins nettement dressé, et n'adhère au substrat que par une surface réduite.



Figure 69 : Lieu de récolte d'*Usnea florida* dans la forêt de Saint-Merd-les-Oussines (19).

Les rameaux sont relativement courts avec des tiges à section ronde plus ou moins ramifiées, et sont couverts de fibrilles. Les apothécies, de 0,5 à 1,5 cm de diamètre, sont situées à l'extrémité des rameaux, et se présentent sous forme de disques un peu concaves, bordés de fibrilles (Figure 70). Par

ses nombreuses apothécies, cette espèce se distingue facilement d'*Usnea subfloridana*, très proche morphologiquement et chimiquement, mais qui se reproduit à l'aide de soralies et ne possède que très rarement des apothécies (Ozenda et Clauzade 1970 ; Dobson, 2005).

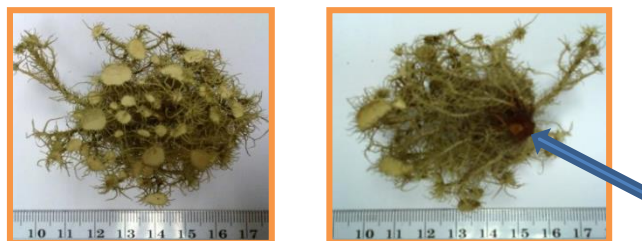


Figure 70 : Aspect général du lichen *Usnea florida*. Face supérieure (à gauche) et face inférieure (à droite) : surface réduite permettant l'adhésion du lichen au support (flèche bleue).

Dans le cas d'*Usnea florida*, les observations à la loupe binoculaire ont été particulièrement utiles pour distinguer les nombreuses papilles courtes et peu allongées, présentes sur les rameaux (Figure 71).

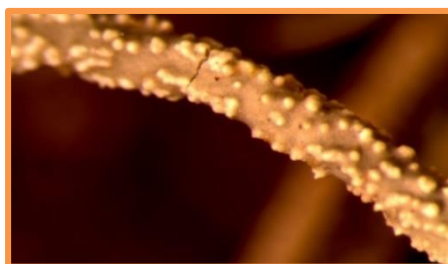


Figure 71 : Observation à la loupe binoculaire des papilles présentes sur les rameaux d'*Usnea florida*
(Grossissement x 22,5).

De nombreux métabolites secondaires sont décrits pour cette espèce avec différentes combinaisons selon les sous-espèces ainsi que leurs origines. Dans tous les cas, l'acide (+)-usnique est présent et parfois accompagné d'atranorine, souvent à l'état de traces. La Figure 72 présente les composés identifiés chez *U. florida*, classés par famille, selon les données disponibles dans la littérature (Fiscus, 1972 ; Clerc, 1984 ; Ohmura, 2012), ainsi que les structures de certains d'entre eux.

Deux chémotypes principaux sont connus en Europe pour cette espèce : les spécimens contenant majoritairement de l'acide thamnolique et de l'acide usnique (avec l'acide alectorialique comme substance accessoire), et les spécimens contenant les acides squamatique et usnique (Clerc, 1984 ; Articus *et al.*, 2002).

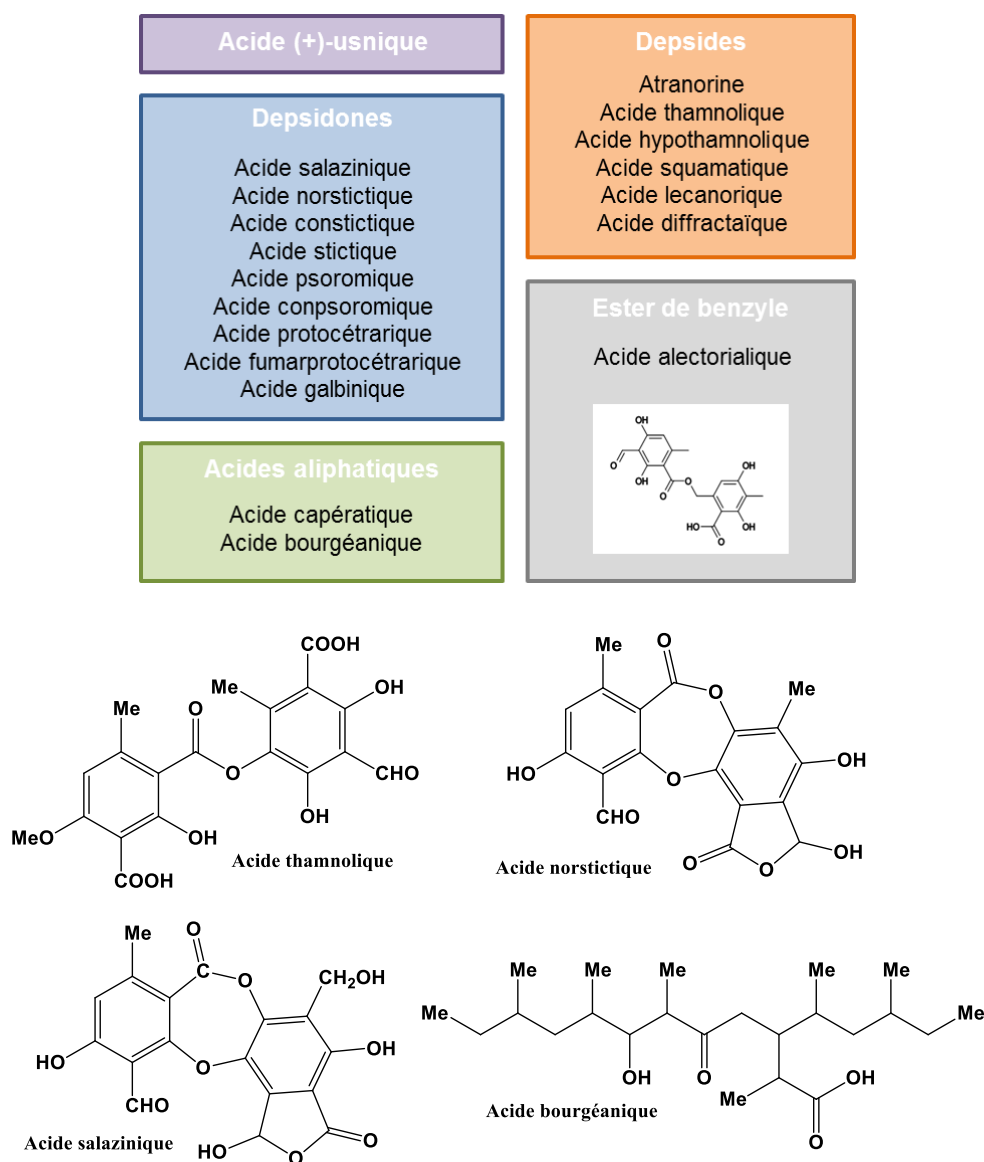


Figure 72 : Composés décrits chez *U. florida* et structures de certains d'entre eux.

1.4.3. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale

Ce lichen, appartenant à la famille des Parmeliaceae, a été récolté sur des troncs d'arbre à Soudeilles (Corrèze) et à Verneuil sur Vienne (Haute-Vienne) (Figure 73). Ce lichen foliacé corticole pousse sur les feuillus (rarement sur les conifères), mais parfois sur des roches ou sur des sols non calcaires. Il s'agit d'une espèce très commune en France, sauf dans les régions froides et dans les hautes montagnes.

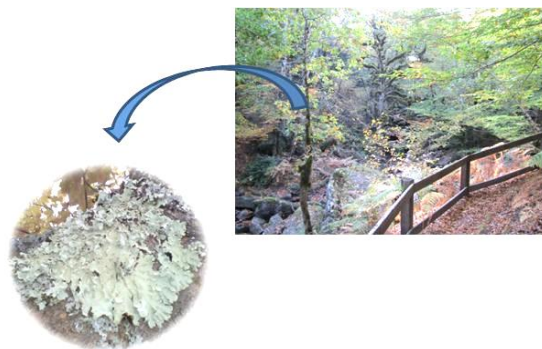


Figure 73 : Lieu de récolte de *Flavoparmelia caperata* à Soudeilles (19).

Le thalle en rosette de teinte vert jaunâtre, est formé de lobes élargis et arrondis aux extrémités, dont la surface est couverte de sorédies granuleuses venant autour de soralies pustuleuses. Il peut atteindre 20 cm de diamètre et se détache facilement du substrat. La face inférieure, noire et brune en périphérie, est garnie de fausses radicelles (rhizines) permettant l'adhésion au support (Figure 74).



Figure 74 : Aspect général du lichen *Flavoparmelia caperata*. Face supérieure (à gauche) et face inférieure (à droite) : bords du thalle de couleur brune (flèche bleue).

Les apothécies sont rares, jusqu'à 8 mm de diamètre, sous forme de disques de couleur brun-rouge. Cette espèce ne doit pas être confondue avec *Parmelia soledians* (médulle K+ jaune puis rouge) qui porte des lobes plus petits et des soralies farineuses.

Par rapport à *U. florida*, beaucoup moins de composés ont été identifiés chez ce lichen. Les métabolites décrits dans la littérature sont l'acide (+)-usnique, les acides protocétrarique, fumarprotocétrarique et salazinique (depsidones), l'atranorine (depside), l'acide capératique (acide aliphatique), l'acide atrarique, l'acide pinastrique ainsi que l'ergostérol et le β -sitostérol 3 β -D-glucopyranoside (Mitrović *et al.*, 2011 ; Manojlović *et al.*, 2012 ; Sharma *et al.*, 2013). Les structures de certains de ces composés sont présentées sur la Figure 75.

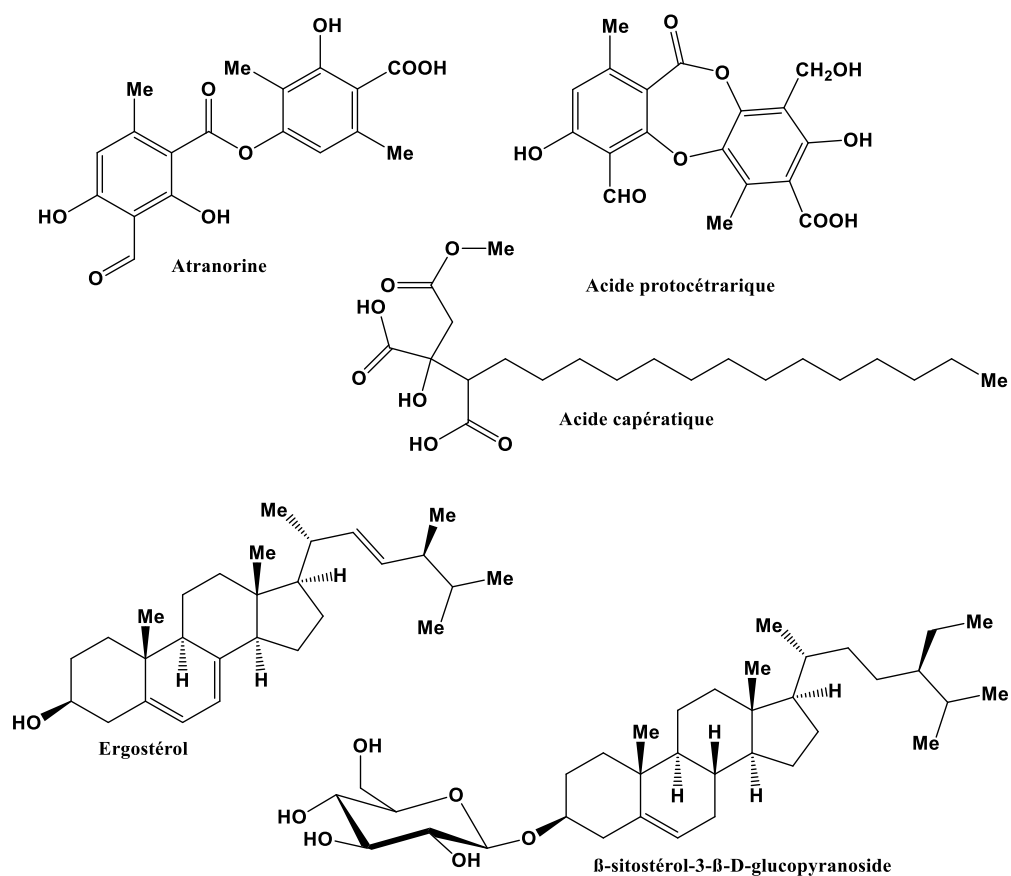


Figure 75 : Structures de certains composés décrits chez *F. caperata*.

Une fois les trois espèces sélectionnées, une extraction par l'acétone a été effectuée sur des masses plus importantes pour chacun des lichens. Le jour de leur récolte, ceux-ci ont été soigneusement nettoyés en enlevant les mousses, la terre et les morceaux d'écorce, puis séchés à l'air ambiant pendant 72 heures. Les extractions ont ensuite été conduites à température ambiante.

II. PREPARATION ET ANALYSE DES EXTRAITS ACETONIQUES

II.1. Extraction par l'acétone

Les lichens secs ont été broyés puis mis au contact de l'acétone. Les extractions ont été réalisées à température ambiante et sous agitation magnétique (Figure 76).

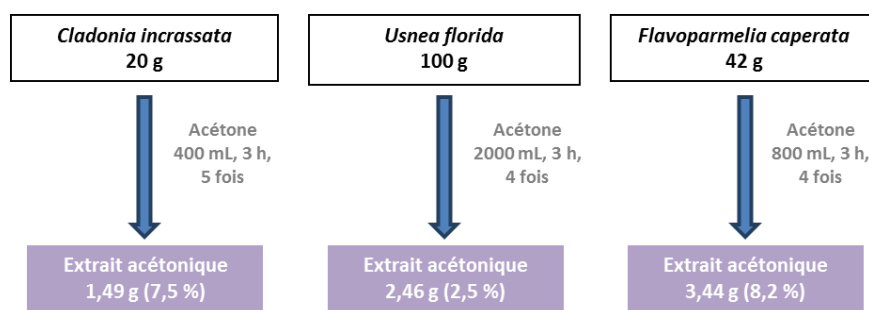


Figure 76 : Schéma d'extraction des lichens. Masses des extraits obtenus (g) et pourcentages d'extraction (%).

Pour chaque lichen, l'extraction a été répétée quatre ou cinq fois afin d'extraire un maximum de métabolites (jusqu'à épuisement c'est-à-dire obtention d'un extrait incolore). Les filtrats des extractions ont ensuite été rassemblés puis concentrés *in vacuo*.

Les pourcentages d'extraction les plus élevés sont observés dans le cas de *C. incrassata* et *F. caperata* avec respectivement 7,5 et 8,2 %, alors que celui estimé pour *U. florida* est environ trois fois plus faible (2,5 %). Aussi, les extraits sont des poudres de différentes couleurs, ce qui témoigne de contenus variés en métabolites (Tableau 5). L'extrait d'*U. florida* est jaune, laissant supposer une proportion importante d'acide usnique.

Tableau 5 : Couleur des extraits acétoniques de *C. incrassata*, *U. florida* et *F. caperata*.

Espèce	<i>C. incrassata</i>	<i>U. florida</i>	<i>F. caperata</i>
Couleur	Marron-rouge	Jaune	Vert pâle
			

Les profils chimiques des trois extraits acétoniques ont ensuite été comparés par chromatographie sur couche mince ainsi que par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes. Ces deux techniques ont permis de mettre en évidence les composés majoritaires des extraits.

II.2. Analyse des extraits acétoniques

II.2.1. Analyse par CCM

Les extraits sont repris dans l'acétone pour atteindre une concentration de 1 mg/mL et 20 μ L sont déposés sur la plaque (soit 20 μ g), développée dans l'éluant toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5 (v/v/v).

Parmi les métabolites secondaires décrits dans la littérature pour les trois espèces, certains sont disponibles au laboratoire. C'est le cas de l'acide (+)-usnique décrit chez *U. florida* et *F. caperata* (acide (-)-usnique chez *C. incrassata*), ainsi que des acides thamnolique et squamatique identifiés chez *C. incrassata* et *U. florida*. L'acide salazinique est également décrit chez *U. florida* (Fiscus, 1972). Ces composés ont donc été utilisés comme témoins pour l'analyse par CCM (Figure 77). Tandis que l'acide usnique ($R_f = 0,79$) est révélé en violet, les acides thamnolique ($R_f = 0,29$) et squamatique ($R_f = 0,37$) (depsides) sont colorés en orange, et l'acide salazinique ($R_f = 0,17$) (depsidone) en jaune.

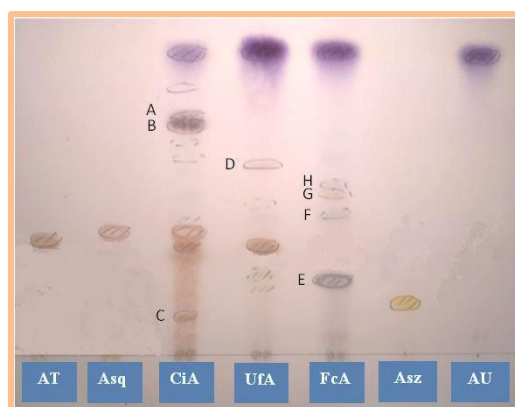


Figure 77 : Profils chimiques des extraits acétoniques par CCM. CiA : extrait de *C. incrassata*, UfA : extrait d'*U. florida*, FcA : extrait de *F. caperata*, AU : acide usnique, Asq : acide squamatique, AT : acide thamnolique, Asz : acide salazinique. Eluant : toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5 (v/v/v).

L'analyse des extraits acétoniques par CCM permet de mettre en évidence un profil plus complexe pour l'extrait de *C. incrassata* avec un plus grand nombre de spots observé par rapport aux deux autres extraits. De plus, ce dernier contient très probablement de l'acide thamnolique et de l'acide squamatique, ainsi que de l'acide usnique, en proportion plus faible par rapport aux extraits

d'*U. florida* et *F. caperata*. L'intensité des deux spots dont les $R_f = 0,64$ et $0,67$ est également notable (A et B) ; de plus, la coloration mauve obtenue après révélation par l'ANS laisse supposer la présence de composés de type dibenzofurane. Un autre spot de $R_f = 0,10$ est révélé en orange (C).

L'acide thamnolique semble également présent dans l'extrait d'*U. florida* dont l'acide usnique paraît être le composé principal. Un autre spot révélé en orange par l'ANS est visible avec un $R_f = 0,52$ (D). Concernant l'extrait de *F. caperata*, en plus de l'acide usnique, un composé majeur se dégage, avec une coloration gris-bleu obtenue par révélation à l'ANS et un $R_f = 0,26$ (E). Enfin, deux autres spots dont les $R_f = 0,40$ et $0,46$ révélés en bleu et orange (F et G), ainsi qu'un troisième ($R_f = 0,49$) révélé en bleu (H) se distinguent. L'acide salazinique, précédemment décrit dans *U. florida* et *F. caperata*, n'est pas détecté ici et n'est donc pas un constituant majoritaire de ces deux extraits acétoniques.

Le Tableau 6 ci-après récapitule, outre l'acide usnique, les composés majoritaires supposés dans les trois extraits acétoniques, sur la base de l'analyse par CCM.

Tableau 6 : Récapitulatif des composés majoritaires supposés présents dans les extraits acétoniques.

R_f	UV	ANS	Composé	<i>C. incrassata</i>	<i>U. florida</i>	<i>F. caperata</i>
0,10	254 nm	orange		+		
0,26	254-365 nm	Gris-bleu				+
0,29	254-365 nm	Orange	AT	+	+	
0,37	254 nm	Orange	Asq	+		
0,40	254 nm	Bleu				+
0,46	254 nm	Orange				+
0,49	254 nm	Bleu				+
0,52	254 nm	Orange			+	
0,64	254-365 nm	Mauve		+		
0,67	254-365 nm	Mauve		+		
0,79	254-365 nm	Violet	AU	+	+	+

AT : acide thamnolique ; ASq : acide squamatique ; AU : acide usnique. Les couleurs indiquées correspondent aux colorations obtenues après révélation par l'ANS.

II.2.2. Analyse par CLHP-UVBD

Cette analyse a permis de détecter les composés aromatiques majoritaires constituant les extraits. Les chromatogrammes obtenus à 230 nm pour les trois extraits acétoniques sont présentés sur la Figure 78 ci-après.

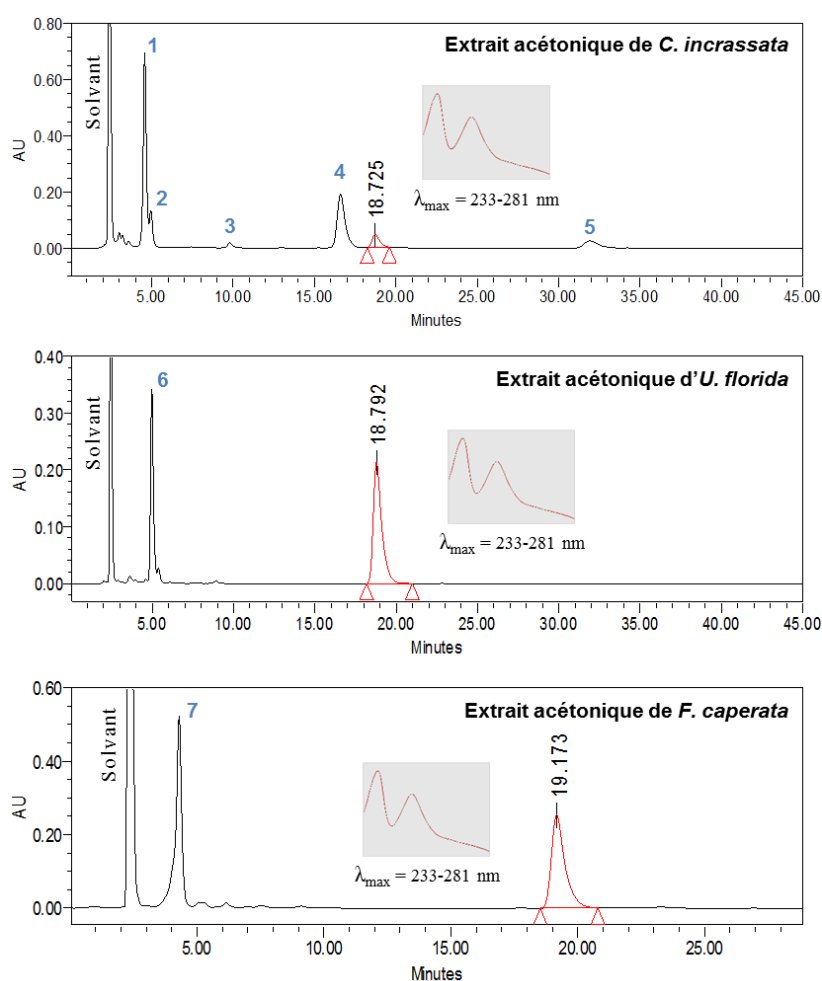









Figure 78 : Profils phytochimiques des extraits obtenus par analyse CLHP-UVBD (à 230 nm). Détection de l'acide usnique (en rouge) (18,73 min < temps de rétention < 19,17 min) dans les trois extraits.

L'analyse par CLHP-UVBD met en évidence les composés majoritaires des extraits et notamment la présence d'acide usnique, commune aux extraits acétoniques des trois lichens avec un temps de rétention compris entre 18,73 et 19,17 minutes, et des λ_{max} à 233 et 281 nm.

La comparaison des spectres UV et des temps de rétention des signaux observés, par rapport aux témoins injectés et aux données de la littérature, permet de confirmer la présence de certains des composés supposés suite à l'analyse par CCM (cf Tableau 6 précédent).

D'une manière générale, l'extrait de *C. incrassata* semble contenir moins d'acide usnique que les deux autres et présente un profil phytochimique plus riche avec deux composés majoritaires, notés 1 et 4. Trois autres signaux (2, 3 et 5) sont également détectés. Les extraits d'*U. florida* et de *F. caperata* renferment chacun deux constituants majoritaires, l'acide usnique ainsi que les composés notés respectivement 6 et 7. Le Tableau 7 présente, outre celles de l'acide usnique, les caractéristiques des signaux observés.

Tableau 7 : Caractéristiques des différents signaux majeurs repérés dans les trois extraits acétoniques.

Espèce	# pic	t _R (min)	Abs (nm)	Spectre UV	Composé supposé
<i>Cladonia incrassata</i>	1	4,62	214, 248, 311		Acide squamatique
	2	5,12	234, 260, 316		Acide thamnolique
	3	10,50	227, 241, 262, 306		-
	4	18,24	227, 241, 262, 306		-
	5	35,89	227, 241, 262, 306		-
<i>Usnea florida</i>	6	5,04	234, 259, 315		Acide thamnolique
<i>Flavoparmelia caperata</i>	7	4,36	212, 241, 318		-

Concernant l'extrait acétonique de *C. incrassata*, le signal 1 majoritaire est identifié comme étant l'acide squamatique, tandis que le signal 2, présent en quantité plus faible, est attribué à l'acide thamnolique. Si les signaux 3, 4 et 5 restent non identifiés, les données spectrales laissent supposer qu'il s'agit de composés de la même famille et dont les structures sont très voisines. En effet, bien qu'ils possèdent des temps de rétention très différents, leurs spectres UV sont strictement identiques.

Concernant l'extrait acétonique d'*U. florida*, le signal 6 est attribué à l'acide thamnolique, deuxième composé majoritaire avec l'acide usnique. Pour l'extrait acétonique de *F. caperata*, le signal 7 avec un temps de rétention à 4,36 minutes est le second composé majoritaire de l'extrait avec l'acide usnique mais n'est pas identifié. Il pourrait s'agir du composé révélé en gris-bleu par l'ANS (observé par CCM).

Si tous les composés majoritaires ne sont à ce stade pas identifiés, l'acide usnique est en revanche le métabolite secondaire commun aux extraits des trois lichens. Il semble largement majoritaire dans ceux d'*U. florida* et de *F. caperata*, et nettement moins présent dans celui de *C. incrassata*. Un dosage par CLHP-UVBD a donc été effectué afin de vérifier cette hypothèse et de comparer les résultats obtenus avec les données disponibles dans la littérature.

II.2.3. Dosage de l'acide usnique dans les extraits

Le dosage est effectué sur le même appareillage et dans des conditions identiques aux analyses précédentes. Pour chaque extrait, le pourcentage massique d'acide usnique est déterminé en tenant compte de l'équation de la droite étalon ainsi que de l'aire sous la courbe donnée pour l'acide usnique. De plus, en considérant que l'extraction par l'acétone permet d'extraire la totalité de l'acide usnique présent dans les lichens, son pourcentage massique au sein de chaque espèce a été évalué en tenant compte des pourcentages d'extraction précédemment obtenus - à savoir 7,5 %, 2,5 % et 6,4 % respectivement pour *C. incrassata*, *U. florida* et *F. caperata* - . Le tableau suivant présente les pourcentages massiques d'acide usnique dans les extraits et les lichens, pour chacune des espèces étudiées (Tableau 8).

Tableau 8 : Pourcentages massiques d'acide usnique dans les extraits acétoniques et dans les lichens.

Espèce	% dans l'extrait	% dans le lichen
<i>C. incrassata</i>	2,8 ± 0,1	0,2 ± 0,01
<i>U. florida</i>	44,4 ± 4,5	1,1 ± 0,1
<i>F. caperata</i>	17,5 ± 0,5	1,4 ± 0,05

Concernant les extraits, le pourcentage massique le plus élevé est observé dans le cas d'*U. florida* avec près de 45 % d'acide usnique constituant l'extrait acétonique. L'extrait de *F. caperata* contient également une quantité élevée de ce composé (17,5 %) tandis que l'extrait de *C. incrassata* en contient beaucoup moins (2,8 %). Cela confirme l'hypothèse émise suite aux analyses par CCM et CLHP-UVBD selon laquelle l'acide usnique est majoritaire dans les extraits d'*U. florida* et *F. caperata*, et minoritaire dans celui de *C. incrassata*.

Concernant les pourcentages massiques d'acide usnique dans les lichens, ils sont compris entre 0,2 et 1,4 %. La valeur la plus faible est observée dans le cas de *C. incrassata* et elle est dix fois inférieure à celle reportée par Huovinen *et al.* sur un échantillon récolté en Suède (2,0 %) (Huovinen *et al.*, 1989). Dans le cas d'*U. florida* et *F. caperata*, les quantités d'acide usnique sont similaires et six fois supérieures par rapport au *Cladonia*. Pour *U. florida*, le pourcentage de 1,1 % est deux fois plus faible que celui retrouvé pour un spécimen récolté en Turquie (Cansaran *et al.*, 2006), tandis que le pourcentage estimé pour *F. caperata* est cohérent avec celui observé pour des échantillons récoltés également en Turquie (en moyenne 1,4 %) (Cansaran Duman *et al.*, 2008). Ces constatations ne sont guère étonnantes étant donné qu'il a été mis en évidence que la quantité d'acide usnique synthétisée par les lichens varie en fonction des conditions environnementales auxquelles ils sont soumis (Ravinskaya, 1991 ; Quilhot *et al.*, 1991b ; Bjerke *et al.*, 2002 ; Bjerke *et al.*, 2005).

II.2.4. Conclusion

D'une part, les résultats obtenus par analyses CCM et CLHP-UVBD mettent en évidence, pour l'extrait de *C. incrassata*, un profil phytochimique renfermant une plus grande variété de métabolites secondaires par rapport aux extraits des deux autres espèces étudiées. En effet, ces derniers semblent contenir majoritairement de l'acide usnique, accompagné par l'acide thamnolique pour *U. florida* et par un composé aromatique inconnu pour *F. caperata*. L'acide thamnolique est également un composé minoritaire dans l'extrait de *C. incrassata*. De plus, la révélation par l'ANS permet de visualiser des colorations caractéristiques de plusieurs familles moléculaires potentiellement présentes dans les trois extraits acétoniques.

D'autre part, le dosage de l'acide usnique dans les extraits confirme l'hypothèse émise, suite aux analyses CCM et CLHP-UVBD, selon laquelle l'extrait acétonique de *C. incrassata* contient peu d'acide usnique par rapport aux deux autres. En effet, le pourcentage d'acide usnique y est respectivement 15 fois et 6 fois inférieur à ceux obtenus pour les extraits d'*U. florida* et *F. caperata*. Rapporté à la masse sèche des lichens, *C. incrassata* contient en moyenne 6 fois moins d'acide usnique qu'*U. florida* et *F. caperata*.

En amont du fractionnement, l'activité antimicrobienne des extraits acétoniques bruts a été évaluée. Des études antérieures ont mis en évidence l'activité d'extraits de *C. incrassata* (Burkholder, 1944), d'*U. florida* (Cansaran *et al.*, 2006) et de *F. caperata* (Cansaran Duman, 2009) vis-à-vis de différentes souches microbiennes.

En vue d'une potentielle application cosmétique des composés qui en seraient isolés, une méthode adaptée du challenge test de la Pharmacopée Européenne (EP 5.1.3 : Efficacité de la conservation antimicrobienne) a dans un premier temps été mise en œuvre. Puis, un test par bioautographie a été réalisé sur les extraits bruts afin de repérer et de mettre en évidence la présence des composés à activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

III. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS

III.1. Méthode adaptée du challenge test

L'activité antimicrobienne des trois extraits acétoniques a été déterminée sur les souches de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* recommandées par la Pharmacopée Européenne (Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé. Efficacité de la conservation antimicrobienne, partie 5.1.3.). Différentes concentrations en extraits (0,05 ; 0,075 et 0,1 % m/v) ont été incubées en présence des cinq souches microbiennes pendant 7 jours et les dénombrements ont été effectués à t0 et t7 jours (Figure 79).

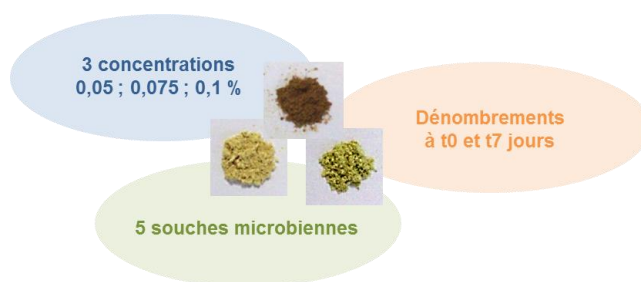


Figure 79 : Conditions appliquées aux trois extraits pour la méthode adaptée du challenge test.

Une diminution de la concentration microbienne par rapport à l'inoculum de départ indique un effet microbicide de l'échantillon testé (mort microbienne), alors qu'une concentration similaire à celle de l'inoculum à t0 témoigne d'un effet microbiostatique (inhibition de la croissance microbienne).

Au cours des essais, l'acide (+)-usnique commercial a également été testé et le Phénonip®, un conservateur correspondant à un mélange de parabènes et de phénoxyéthanol employé dans l'industrie cosmétique, a été utilisé comme témoin positif. Celui-ci a été testé à une concentration de 0,8 % classiquement retrouvée dans les produits cosmétiques.

Concernant les bactéries à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, aucune activité bactériostatique ou bactéricide n'a été observée pour les différentes concentrations utilisées en extraits et en acide usnique. Les résultats qui suivent portent donc sur les souches *Staphylococcus aureus* (bactérie à Gram positif), *Candida albicans* (levure) et *Aspergillus brasiliensis* (champignon).

III.1.1. Activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus*

La Figure 80 présente les résultats obtenus pour les trois concentrations des trois extraits sur *S. aureus* dès le premier jour (temps zéro) et après 7 jours d'incubation.

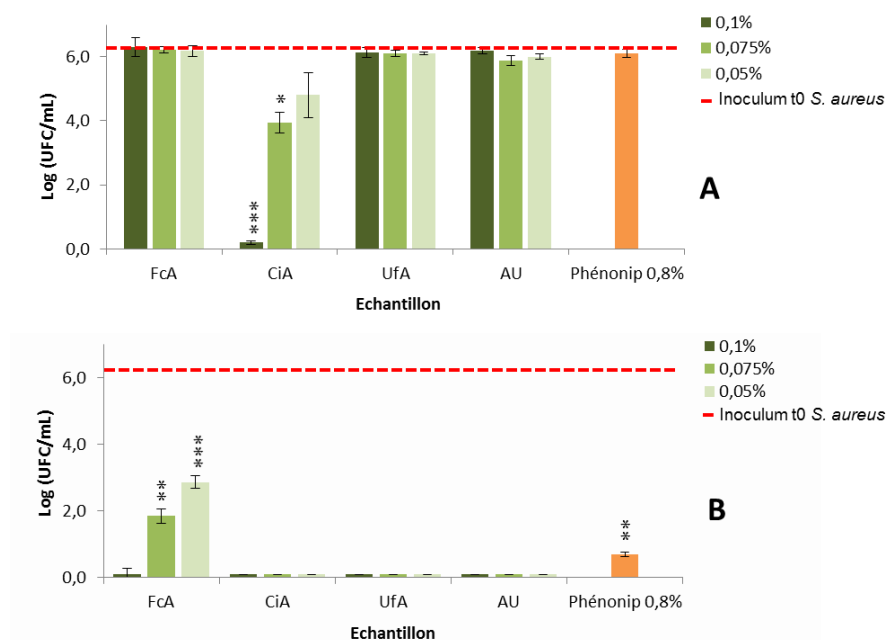


Figure 80 : Activité des extraits sur *S. aureus* le premier jour (t0) (A) et après 7 jours d'incubation (B). FcA : extrait acétonique de *F. caperata*, CiA : extrait acétonique de *C. incrassata*, UfA : extrait acétonique d'*U. florida* et AU : acide usnique, testés à 0,075 ; 0,05 et 0,1 %. Chaque donnée correspond à la moyenne de 6 réplicats \pm écart type. Les résultats ont été analysés par un test de Student de type t avec *p < 0,05 ; **p < 0,01 et ***p < 0,001 par rapport au témoin acide usnique. Le Phénonip® testé à 0,8 % a également été utilisé comme témoin positif.

Dès le premier jour (Figure 80A), une activité bactéricide rapide est observée dans le cas de l'extrait de *C. incrassata*, en particulier pour la concentration la plus élevée (0,1 %) pour laquelle la quasi-totalité des bactéries a été éliminée. Pour les solutions à 0,05 et 0,075 %, une diminution respective de 1 et 2 log est également mise en évidence. L'extrait de *C. incrassata* étant celui contenant le moins d'acide usnique, son action bactéricide rapide serait donc induite par d'autres composés bioactifs. En effet, pour les autres extraits, l'acide usnique et le Phénonip®, aucun effet significatif n'est remarqué au temps t0.

Après 7 jours d'incubation (Figure 80B), les extraits de *C. incrassata* et d'*U. florida*, pour les trois concentrations testées ainsi que l'acide usnique, montrent une forte activité bactéricide sur *S. aureus* et sont significativement plus actifs que le Phénonip® à 0,8% (qui permet une diminution de 5 log par rapport à l'inoculum). Concernant l'extrait de *F. caperata*, la solution à 0,1 % présente également une forte activité bactéricide. Aussi, cet extrait à 0,05 et 0,075 % permet des diminutions respectives de 3 et 4 log par rapport à la concentration bactérienne initiale.

Enfin, quelles que soient les concentrations testées, tous les échantillons respectent le critère A de la Pharmacopée Européenne qui recommande une diminution de 3 log pour les bactéries par rapport à l'inoculum après 7 jours d'incubation.

III.1.2. Activité antifongique sur *Candida albicans*

La Figure 81 présente les résultats obtenus pour les trois concentrations des trois extraits sur *C. albicans* dès le premier jour (temps zéro) et après 7 jours d'incubation.

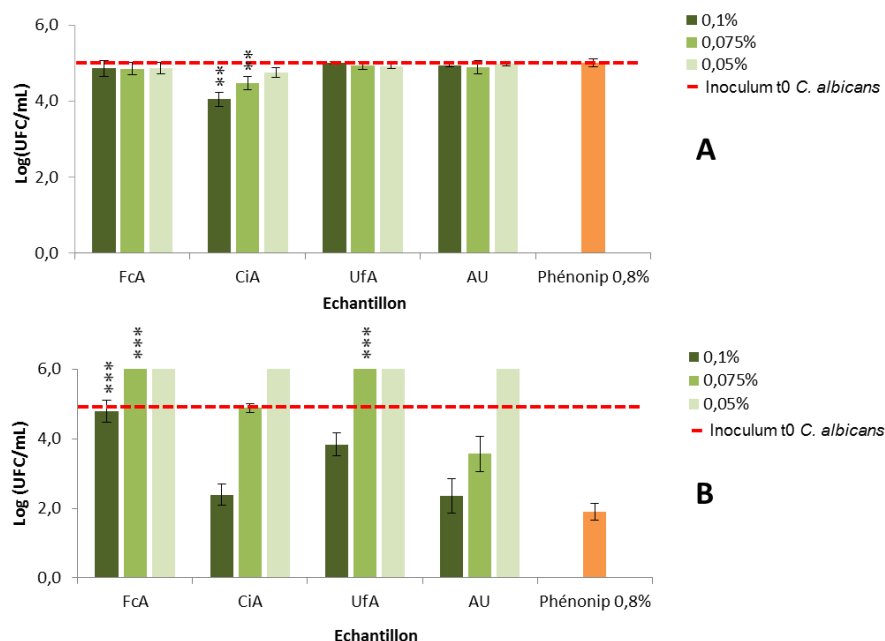


Figure 81 : Activité des extraits sur *C. albicans* le premier jour (t0) (A) et après 7 jours d'incubation (B). FcA : extrait acétonique de *F. caperata*, CiA : extrait acétonique de *C. incrassata*, UfA : extrait acétonique d'*U. florida* et AU : acide usnique, testés à 0,075 ; 0,05 et 0,1 %. Chaque donnée correspond à la moyenne de 6 réplicats \pm écart type. Les résultats ont été analysés par un test de Student de type t avec *p < 0,05 ; **p < 0,01 et ***p < 0,001 par rapport au témoin acide usnique. Le Phénopip® testé à 0,8 % a également été utilisé comme témoin positif.

Dès le premier jour (Figure 81A), une activité fongicide est observée pour l'extrait de *C. incrassata* concentré à 0,1 % avec une diminution de 1 log par rapport à l'inoculum. Si cette activité est moins importante que pour *S. aureus*, elle reste néanmoins remarquable pour *C. incrassata* comparé aux autres extraits et significative par rapport à l'acide usnique (p < 0,01). Dans le cas des extraits de *F. caperata* et *U. florida*, de l'acide usnique et du Phénopip®, aucun effet fongicide n'est observé.

Après 7 jours d'incubation (Figure 81B), la solution à 0,1 % pour *F. caperata* et celle à 0,05 % pour *C. incrassata* montrent une activité fongistatique sur la levure avec une absence de croissance par rapport à l'inoculum. Les solutions concentrées à 0,1 % en extrait de *C. incrassata* et en acide usnique présentent des activités fongicides similaires à celle du Phénopip® à 0,8% sur *C. albicans* avec une diminution d'environ 3 log par rapport à l'inoculum. Ces deux solutions conduisent à une réduction logarithmique au bout de 7 jours comparable à celle recommandée par la Pharmacopée Européenne

pour une période d'incubation de 14 jours. La solution à 0,1 % en extrait d'*U. florida* et celle à 0,05 % en acide usnique ont des effets fongicides comparables avec une diminution supérieure à 1 log par rapport à l'inoculum.

Pour les autres conditions, des concentrations en micro-organismes nettement supérieures à l'inoculum sont observées, ce qui traduit une croissance de *C. albicans* et donc aucun effet fongistatique ni fongicide.

III.1.3. Activité antifongique sur *Aspergillus brasiliensis*

La Figure 82 présente les résultats obtenus pour les trois concentrations des trois extraits sur *A. brasiliensis* dès le premier jour (temps zéro) et après 7 jours d'incubation.

Dès le premier jour (Figure 82A), une légère activité fongicide est observée dans le cas du Phénonip® à 0,8 % contrairement aux extraits lichéniques et à l'acide usnique.

Après 7 jours d'incubation (Figure 82B), toutes les concentrations testées pour *C. incrassata* montrent une activité fongistatique par une absence de croissance par rapport à l'inoculum. Pour l'extrait de *F. caperata* et l'acide usnique, une faible activité fongicide est observée, plus marquée dans le cas des solutions à 0,1 %. Concernant l'extrait d'*U. florida*, l'activité fongicide est significativement supérieure à celle de l'acide usnique pour les trois concentrations testées. Les concentrations 0,05 et 0,075 % ont un effet fongicide proche de celui du Phénonip® (diminution de 1,5 log comparé à l'inoculum). Pour la solution à 0,1 %, l'activité fongicide est supérieure à celle du Phénonip® avec une diminution de plus de 2 Log par rapport à l'inoculum.

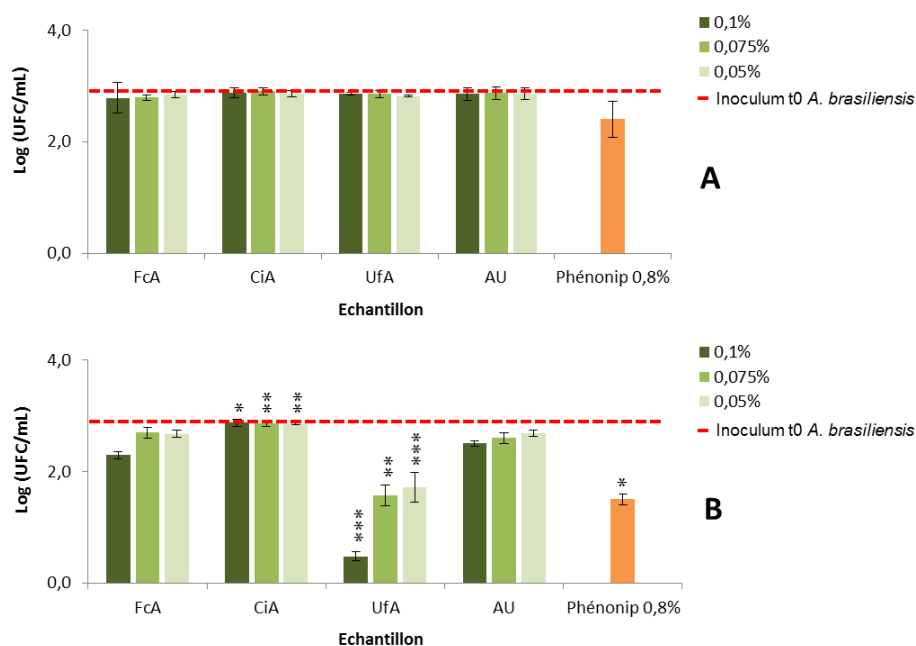


Figure 82 : Activité des extraits sur *A. brasiliensis* le premier jour (t0) (A) et après 7 jours d'incubation (B). FcA : extrait acétonique de *F. caperata*, CiA : extrait acétonique de *C. incrassata*, UfA : extrait acétonique d'*U. florida* et AU : acide usnique, testés à 0,075 ; 0,05 et 0,1 %. Chaque donnée correspond à la moyenne de 6 réplicats \pm écart type. Les résultats ont été analysés par un test de Student de type t avec *p < 0,05 ; **p < 0,01 et ***p < 0,001 par rapport au témoin acide usnique. Le Phénolip® testé à 0,8 % a également été utilisé comme témoin positif.

Pour les trois souches testées (*S. aureus*, *C. albicans* et *A. brasiliensis*), les extraits lichéniques, notamment ceux de *C. incrassata* et *U. florida*, présentent des activités microbicides similaires ou supérieures à celle de l'acide usnique. Afin d'évaluer l'implication de ce dernier dans l'activité antimicrobienne des extraits acétoniques, les coefficients de corrélation ont été calculés pour certaines conditions.

III.1.4. Corrélation entre la quantité d'acide usnique présente dans les extraits & l'activité antimicrobienne

Les coefficients de corrélation R^2 entre la concentration microbienne (exprimée en log (UFC/mL)) et la quantité d'acide usnique présente dans les extraits (2,8 ; 17,5 et 44,4 % d'acide usnique respectivement pour les extraits de *C. incrassata*, *F. caperata* et *U. florida*) ont été déterminés pour *S. aureus* au temps zéro, ainsi que pour *C. albicans* et *A. brasiliensis* après 7 jours d'incubation (Exemple pour *S. aureus*, Figure 83).

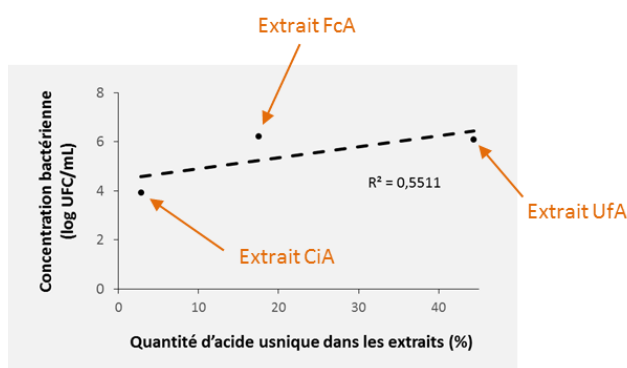


Figure 83 : Graphique de corrélation entre la concentration bactérienne et la quantité d'acide usnique dans les extraits.

Exemple pour *S. aureus* à t0 et pour une concentration en extraits testée de 0,075 % (m/v).

La quantité d'acide usnique dans les extraits est de 2,8 ; 17,5 et 44,4 % (m/m) respectivement pour les extraits de *C. incrassata* (CiA), *F. caperata* (FcA) et *U. florida* (UfA).

Les coefficients de corrélation R^2 obtenus mettent en évidence que l'activité des extraits sur *S. aureus* n'est pas uniquement liée à la présence d'acide usnique (Tableau 9). En effet, il existe une corrélation moyenne entre le nombre de micro-organismes déterminé et la quantité d'acide usnique dosée dans les extraits. Pour chacune des concentrations testées (0,1 ; 0,075 et 0,05 %), les coefficients de corrélation calculés sont compris entre 0,54 et 0,57. Dans le cas de *C. albicans*, il existe une corrélation encore plus faible entre l'activité antifongique et la quantité d'acide usnique présente dans les extraits, avec un coefficient de corrélation d'environ 0,21. Enfin, dans le cas d'*A. brasiliensis*, la corrélation entre la quantité de bactéries déterminée est plus élevée que pour *S. aureus* et *C. albicans* mais reste toujours moyenne, avec un R^2 d'environ 0,69.

Tableau 9 : Corrélation entre la quantité d'acide usnique dans les extraits et l'activité antimicrobienne.

Souche microbienne	<i>S. aureus</i> (t0)			<i>C. albicans</i> (t7)	<i>A. brasiliensis</i> (t7)
Concentration en extraits	0,1 %	0,075 %	0,05 %	0,1 %	0,1 %
Coefficient de corrélation R^2	0,5713	0,5511	0,5423	0,2084	0,6926

Pour les trois souches testées, les résultats obtenus indiquent que des composés autres que l'acide usnique contribueraient à l'activité antimicrobienne des extraits, en particulier d'un point de vue cinétique pour celui de *C. incrassata* qui présente une activité bactéricide dès t0, contrairement à l'acide usnique. La quantité d'acide usnique dans les extraits semble jouer un rôle plus important sur la souche d'*A. brasiliensis* par rapport à *S. aureus* et *C. albicans* avec un coefficient de corrélation plus élevé. L'acide usnique n'expliquerait donc pas à lui seul l'activité des extraits sur les micro-organismes testés, ce qui laisse supposer une action cumulée ou synergique avec les autres composés présents.

III.1.5. Discussion

D'une manière générale, les extraits ne sont pas actifs sur les bactéries à Gram négatif testées (*P. aeruginosa* et *E. coli*) contrairement au Phénopip®, mais ils présentent des activités intéressantes sur *S. aureus*, *C. albicans* et *A. brasiliensis* avec des effets microbicides similaires à ceux du mélange de parabènes, et ce, pour des concentrations entre 8 et 16 fois plus faibles.

L'absence d'activité des extraits et de l'acide usnique, aux concentrations testées, sur les bactéries à Gram négatif *P. aeruginosa* et *E. coli* est cohérente avec les données de la littérature. Les bactéries à Gram positif sont généralement décrites comme plus sensibles à l'activité antibiotique des métabolites lichéniques que les bactéries à Gram négatif (Rowe *et al.*, 1989 ; Cansaran Duman, 2009). Cette constatation est attribuée principalement aux différences de composition de la paroi entre ces deux types de bactéries. En effet, la paroi des bactéries à Gram positif est généralement assez épaisse (20 à 80 nm) et essentiellement constituée par le peptidoglycane, tandis que la paroi des bactéries à Gram négatif est plus fine mais possède une membrane externe protectrice (Figure 84).

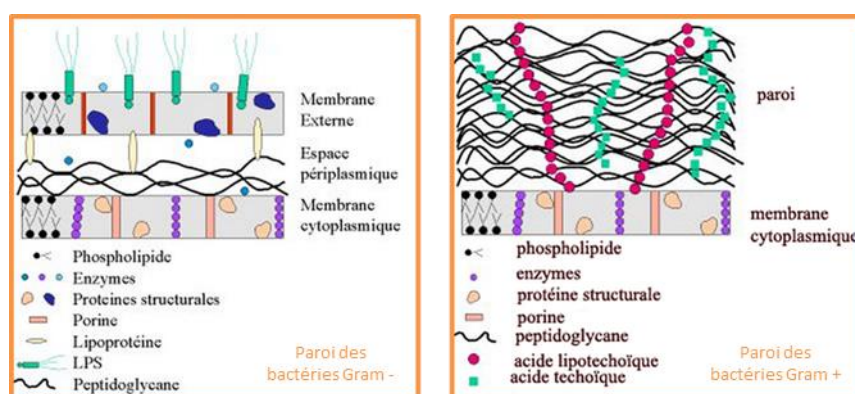


Figure 84 : Représentations schématiques des structures des parois des bactéries à Gram négatif (à gauche) et des bactéries à Gram positif (à droite) (<http://acces.ens-lyon.fr/>).

Concernant la bactérie à Gram positif *S. aureus*, nos résultats montrent une activité bactéricide très rapide de l'extrait de *C. incrassata* pour les trois concentrations (dans la demi-heure suivant l'inoculation), contrairement aux autres extraits, à l'acide usnique et au Phénopip®. L'extrait contient donc des composés particulièrement efficaces sur cette souche, comparé à l'acide usnique et au Phénopip® qui possèdent des activités antibactériennes reconnues. Ce constat est d'autant plus intéressant qu'il s'agit de l'extrait contenant le moins d'acide usnique, par rapport à *U. florida* et *F. caperata*. L'extrait de *C. incrassata* contient donc des métabolites secondaires, autres que l'acide usnique, qui induisent un important effet bactéricide.

Après 7 jours d'incubation, la solution à 0,1 % en extrait de *F. caperata*, toutes les concentrations des extraits de *C. incrassata*, d'*U. florida*, et d'acide usnique montrent un effet supérieur à celui du

Phénonip® avec une disparition totale des bactéries. Les concentrations 0,075 et 0,05 % en extraits de *F. caperata* sont moins actives mais respectent néanmoins les recommandations de la Pharmacopée Européenne en termes de diminution du nombre de micro-organismes par rapport à l'inoculum.

Les résultats obtenus au cours de ce travail mettent également en évidence une activité plus faible des extraits et de l'acide usnique sur *C. albicans* et *A. brasiliensis* par rapport à *S. aureus*.

En effet, sur *C. albicans*, une activité nettement moins marquée que sur *S. aureus* est observée dans le cas de *C. incrassata*. Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle cet extrait contient des composés, autres que l'acide usnique, responsables de son activité. Après 7 jours d'incubation, des activités fongicides comparables à celle du Phénonip® sont observées pour les concentrations les plus élevées de *C. incrassata* et d'acide usnique. Pour une concentration de 0,1 %, l'extrait d'*U. florida* est également fongicide alors que celui de *F. caperata* est fongistatique.

Concernant *A. brasiliensis*, l'extrait d'*U. florida* montre la meilleure activité avec, pour la concentration 0,1 %, un pouvoir fongicide supérieur à celui du Phénonip®, tandis qu'un faible effet fongicide est observé pour l'extrait de *F. caperata* et l'acide usnique. Enfin, quelle que soit la concentration, une activité fongistatique est démontrée pour *C. incrassata*.

Ces résultats sont en accord avec la littérature puisque les champignons et levures sont connus pour être généralement plus résistants que les bactéries à l'action des métabolites secondaires lichéniques. Ces constatations s'expliquent en particulier par des différences de composition et de perméabilité des parois cellulaires (Kosanić *et al.*, 2012 ; Manojlović *et al.*, 2012). En effet, la paroi des bactéries à Gram positif est constituée de la membrane plasmique, du peptidoglycane et de polymères (acides téichoïques et lipotéichoïques). La paroi des bactéries à Gram négatif est constituée de la membrane plasmique, de lipopolysaccharides, de lipoprotéines et de la membrane externe. La paroi des champignons et des levures est formée majoritairement de glycoprotéines et de polysaccharides tels que la chitine, les glucanes et les mannanes (Bowman et Free, 2006) (Figure 85).

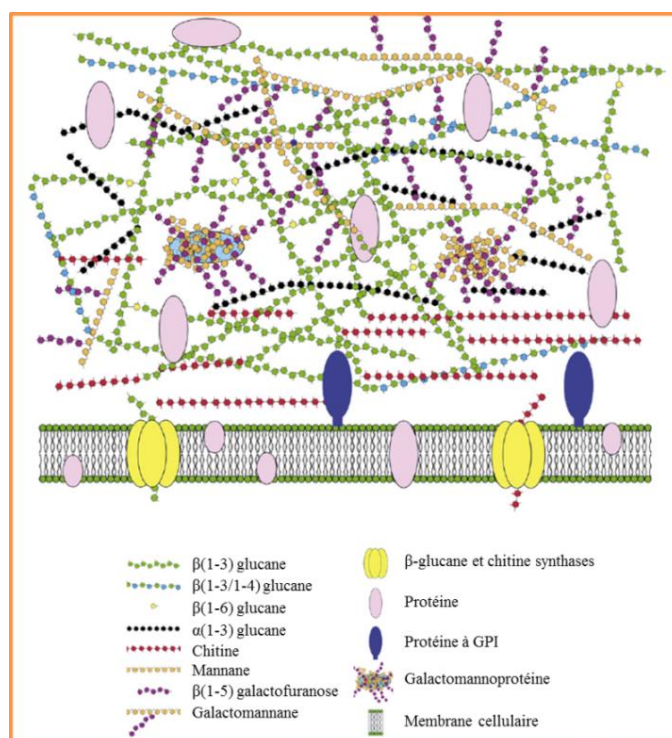


Figure 85 : Structure de la membrane cellulaire fongique (schéma adapté de Abad *et al.*, 2010).

Au cours d'une étude précédente, la sensibilité des bactéries à Gram positif à l'acide usnique en comparaison avec les bactéries à Gram négatif, champignons et levures a été démontrée (Seifert et Bertram, 1995). L'utilisation de l'acide usnique en tant que conservateur dans une crème hydratante a été testée par challenge test à des concentrations de 0,25 ; 0,5 et 1 % (masse/masse) sur des bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *Streptococcus faecalis*), des bactéries à Gram négatif (*P. aeruginosa* et *Providencia rettgeri*) ainsi que sur *A. brasiliensis* et *C. albicans*. Après 14 jours d'incubation, une activité bactéricide totale sur les bactéries à Gram positif a été observée avec 0,5 % d'acide usnique dans la crème, tandis qu'une concentration de 1 % d'acide usnique a été nécessaire pour un effet bactéricide total sur les bactéries à Gram négatif, et un effet fongicide total sur le champignon et la levure.

De plus, il a été démontré sur des extraits éther diéthylique, chloroforme et éthanol de *C. incrassata* et par la technique des cylindres (méthode de diffusion), qu'il n'y a aucune activité sur *E. coli* et *S. aureus*, alors qu'un effet antibactérien a été observé vis-à-vis de *Bacillus subtilis* (bactérie à Gram positif) (Burkholder *et al.*, 1944). Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant l'activité antimicrobienne d'extraits d'*U. florida*. Par la méthode des disques (diffusion), l'effet d'un extrait acétonique a été mis en évidence sur *B. subtilis* et *B. megaterium*, alors qu'aucune activité n'a été observée sur *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* (Cansaran *et al.*, 2006). Une autre étude a démontré une faible activité des extraits dichlorométhane et méthanol sur *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*, et

aucun effet sur *C. albicans* et *A. niger* (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2008). Concernant *F. caperata*, des études ont souligné l'activité d'extraits acétoniques sur *S. aureus* et *E.coli*, ainsi que l'absence d'effet sur *P. aeruginosa* (Rowe *et al.*, 1989 ; Kosanić *et al.*, 2012). Néanmoins, une étude sur un autre extrait de ce lichen n'a pas montré d'activité sur *S. aureus* (Cansaran Duman, 2009). En outre, un autre travail a mis en évidence l'activité d'extraits acétonique et méthanolique de *F. caperata* sur *S. aureus*, *C. albicans* et *A. fumigatus*, mais aucun effet sur *E. coli* (Ranković *et al.*, 2009).

Les résultats de notre étude apportent des informations nouvelles et complémentaires à celles de la littérature concernant l'activité antimicrobienne des extraits acétoniques des lichens *C. incrassata*, *F. caperata* et *U. florida*. Cependant, il n'est pas aisé de les comparer avec ceux présentés dans la littérature car les techniques utilisées pour déterminer l'activité des extraits ainsi que les concentrations et les souches microbiennes testées sont variées. De plus, pour une même espèce, les contenus en métabolites secondaires peuvent être différents selon l'origine et les conditions environnementales auxquelles a été soumis le lichen. Enfin, pour chaque espèce, plusieurs variétés et sous-espèces existent, ce qui constitue un facteur supplémentaire expliquant la variabilité des résultats. Les activités reportées dans la littérature pour les extraits de *C. incrassata*, d'*U. florida* et de *F. caperata* sont donc hétérogènes (Tableau 10).

Tableau 10 : Activités antimicrobiennes reportées dans la littérature et pour ce travail pour les extraits de *C. incrassata*, *U. florida* et *F. caperata* (- : pas d'activité antimicrobienne, + : activité antimicrobienne, ND : activité non déterminée)

Espèces	Extraits	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	Méthodes	Références
<i>C. incrassata</i>	Ether diéthylique	-	-	ND	ND	ND		
	Chloroforme	-	-	ND	ND	ND	Cylindres	Burkholder <i>et al.</i> , 1944
	Ethanol	-	-	ND	ND	ND		
	Acétone	+	-	-	+	+	Dilution	Résultats de cette étude
<i>U. florida</i>	Acétone	-	-	-	ND	ND	Disques	Cansaran <i>et al.</i> , 2006
	Dichlorométhane	+	+	+	-	ND	Dilution	Schmeda-Hirschmann <i>et al.</i> , 2008
	Méthanol	+	+	+	-	ND	Dilution	
	Acétone	+	-	-	+	ND	Dilution	Résultats de cette étude
<i>F. caperata</i>	Acétone	+	+	ND	ND	ND	Disques	Rowe <i>et al.</i> , 1989
	Acétone	-	+	-	ND	ND	Disques	Cansaran Duman, 2009
	Acétone	+	+	ND	+	ND	Dilution	Kosanić <i>et al.</i> , 2012
	Méthanol	+	-	ND	+	ND	Disques & dilution	Ranković <i>et al.</i> , 2009
	Acétone	+	-	ND	+	ND		
	Acétone	+	-	-	+	+	Dilution	Résultats de cette étude

Les extraits acétoniques des trois espèces de lichen possèdent des activités différentes selon les souches testées. Ils présentent une activité antimicrobienne équivalente voire plus importante par rapport à celle du Phénopip®, et à des concentrations plus faibles. L'activité la plus remarquable est celle observée dans le cas de *S. aureus*. Des expériences en milieu liquide ont ensuite été mises en œuvre sur les trois extraits afin d'évaluer leur pourcentage d'inhibition de croissance et leur concentration minimale inhibitrice sur cette souche.

III.2. Détermination des pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne et des concentrations minimales inhibitrices

Les trois extraits acétoniques ont été testés sur *S. aureus* aux concentrations de 25, 30, 35 et 40 µg/mL. Le Phénonip® ainsi que la ciprofloxacine ont été utilisés comme témoins positifs. Le pourcentage d'inhibition de croissance bactérienne est défini selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 \times \left[1 - \left[\frac{\text{Nb bactéries traitées} - \text{Nb bactéries t0}}{\text{Nb bactéries témoin t24} - \text{Nb bactéries t0}} \right] \right]$$

Avec :

- Nb bactéries traitées : nombre de bactéries après 24h de traitement à 37°C.
- Nb bactéries t0 : nombre de bactéries inoculées au temps t0.
- Nb bactéries t24 : nombre de bactéries témoin après incubation 24h à 37°C (sans traitement).

La Figure 86 présente les pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne obtenus pour les trois extraits aux quatre concentrations testées (A) et les témoins positifs (B).

Concernant *U. florida*, une inhibition de croissance de 100 % est observée à partir de 30 µg/mL d'extrait, ce qui correspond à sa concentration minimale inhibitrice (CMI). Une CMI supérieure à 300 µg/mL pour le Phénonip®, ainsi qu'une CMI de 1 µg/mL pour la ciprofloxacine ont été obtenues pour les témoins positifs de notre étude. L'extrait d'*U. florida* présente une activité nettement plus importante que le Phénonip® sur la souche de *S. aureus* testée mais il est cependant moins actif que la ciprofloxacine qui possède une CMI 30 fois inférieure.

De plus, bien que la CMI de l'extrait acétonique de *F. caperata* n'ait pas été déterminée, le résultat obtenu laisse envisager qu'elle serait inférieure à celle du Phénonip® car, à 40 µg/mL, une inhibition de croissance proche de 100 % est observée.

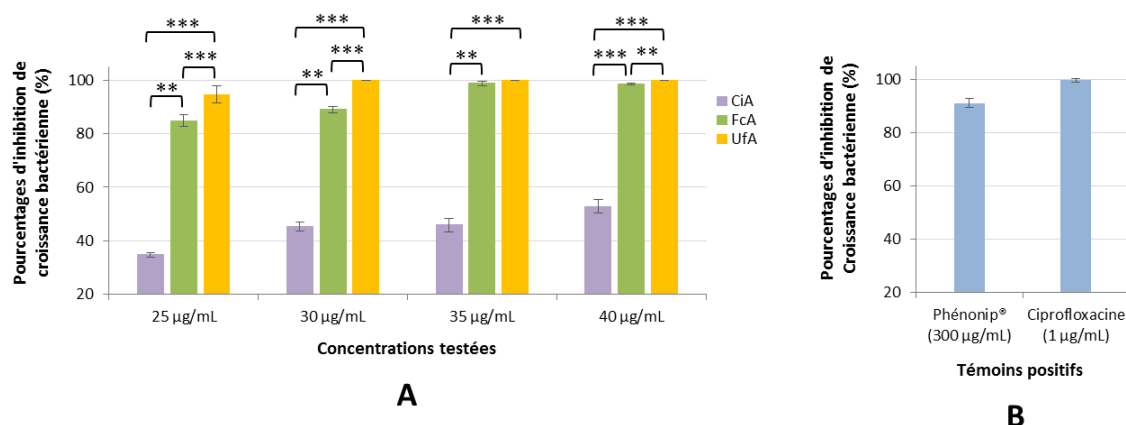


Figure 86 : Pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne obtenus sur *S. aureus* pour les extraits acétoniques (A) et pour les témoins positifs (Phénopip® à 300 µg/mL et ciprofloxacine à 1 µg/mL) (B). Extraits de *Cladonia incrassata* (CiA), *Flavoparmelia caperata* (FcA) et *Usnea florida* (UfA), testés à 25, 30, 35 et 40 µg/mL. Les résultats ont été analysés par un test de Student de type t avec *p < 0,05 ; **p < 0,01 et ***p < 0,001.

Aux différentes concentrations testées, l'extrait acétonique de *C. incrassata* présente des pourcentages d'inhibition plus faibles que pour les deux autres extraits acétoniques d'*U. florida* et de *F. caperata*. Il semblerait qu'il y ait une corrélation positive entre la concentration en acide usnique des extraits et l'activité antibactérienne sur *S. aureus*. Cependant, les coefficients de corrélation R^2 ont été calculés afin d'évaluer l'effet de la quantité d'acide usnique dans les extraits sur l'activité antibactérienne. Le Tableau 11 présente les coefficients de corrélation obtenus, pour les 4 concentrations testées (25 à 40 µg/mL), entre la concentration bactérienne et la quantité d'acide usnique présente dans les extraits (2,8 ; 17,5 et 44,4 % d'acide usnique respectivement pour les extraits de *C. incrassata*, *F. caperata* et *U. florida*).

Tableau 11 : Corrélation entre la quantité d'acide usnique dans les extraits et l'activité antibactérienne.

Concentration en extraits	25 µg/mL	30 µg/mL	35 µg/mL	40 µg/mL
Coefficient de corrélation R^2	0,7360	0,7686	0,6127	0,6211

Bien que l'extrait d'*U. florida* soit celui qui présente la meilleure activité sur *S. aureus*, les coefficients de corrélation R^2 calculés mettent en évidence une relation moyenne entre la quantité d'acide usnique présente dans les extraits et leur activité antibactérienne. L'acide usnique n'est donc pas le seul composé responsable de l'inhibition de croissance bactérienne. Ces constatations sont cohérentes avec les résultats obtenus par le challenge test et laissent supposer que l'activité antibactérienne observée résulte de l'action complexe de plusieurs composés, dont l'acide usnique, présents dans les extraits.

Pour vérifier cette hypothèse, des tests par bioautographie ont été effectués sur *S. aureus*, afin de détecter et de repérer les composés bioactifs présents dans les extraits lichéniques.

III.3. Mise en évidence des composés antibactériens par bioautographie

La bioautographie est une technique de contact, dite semi-quantitative, qui repose sur la migration des composés du chromatogramme vers le milieu de culture contenant le micro-organisme à tester (Choma et Grzelak, 2011). Parmi les méthodes reportées dans la littérature, la méthode dite «agar overlay» a été sélectionnée pour ce travail. En amont de ce test d'activité, il a été nécessaire de mettre au point un éluant permettant une séparation optimale des composés. Sachant que l'acide usnique est présent dans tous les extraits et qu'il est antibactérien, l'objectif était d'utiliser un éluant entraînant la plus grande distance de migration possible entre celui-ci et les autres composés. Ainsi, la zone d'inhibition engendrée par l'activité de l'acide usnique ne masquerait pas l'effet antibactérien potentiel des autres composés.

L'éluant de base toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5 (v/v/v) a donc été modifié afin de déterminer le système de solvants suivant : toluène/chloroforme/acétone/méthanol/acide formique 80/20/40/2/5 (v/v/v/v/v). Ce dernier permet d'augmenter le rapport frontal de l'acide usnique ($R_f = 0,79$ à $R_f = 0,90$), tout en conservant une bonne séparation des autres composés présents dans les extraits.

Chaque extrait a été déposé sur plaque CCM et deux témoins positifs ont été utilisés : le Phénopip®, correspondant à un mélange de parabènes et de phénoxyéthanol, ainsi qu'un antibiotique, la ciprofloxacine. Une fois la migration terminée, une fine couche de milieu de culture tryptone-soja gélosé inoculé par *S. aureus* a ensuite été coulée sur chaque plaque. Après une incubation pendant 24 heures à 30°C, une pulvérisation de la gélose par le MTT a permis de visualiser les zones d'inhibition révélant la présence de composés actifs (Figure 87).

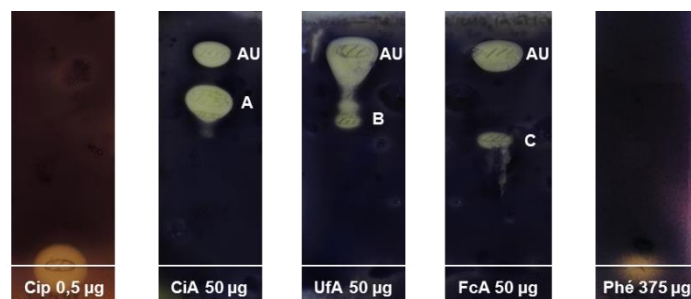


Figure 87 : Technique de bioautographie appliquée aux extraits acétoniques de *C. incrassata* (CiA), *U. florida* (UfA) et *F. caperata* (FcA). La coloration violette indique la présence des micro-organismes vivants, tandis que les zones d'inhibition blanchâtres mettent en évidence l'activité des composés vis-à-vis de *S. aureus*. AU : acide usnique ; Cip : ciprofloxacine ;

Phé : Phénopip®. Eluant : toluène/chloroforme/acétone/méthanol/acide formique 80/20/40/2/5 (v/v/v/v/v).

Dans les trois cas, l'acide usnique montre une activité intense sur la souche bactérienne testée. En outre, d'autres spots (notés A, B et C), correspondant chacun à un ou plusieurs composés, possèdent également des activités intéressantes sur *S. aureus*. Ces composés sont moins actifs que la ciprofloxacine, qui induit un diamètre d'inhibition important pour seulement 0,5 µg déposés. Néanmoins, leur effet sur *S. aureus* semble bien supérieur à celui du Phénonip®, qui ne présente qu'une faible zone d'inhibition pour 375 µg déposés.

Les tests par bioautographie effectués sur les extraits bruts confirment les résultats précédents du challenge test et en milieu liquide (microplaques). En effet, l'activité antibactérienne sur *S. aureus* n'est pas seulement tributaire de l'acide usnique.

III.4. Conclusion sur l'activité antimicrobienne des extraits

Au cours de ce travail, trois techniques différentes, apportant des informations complémentaires, ont été mises en œuvre afin de caractériser l'activité antimicrobienne des extraits acétoniques de *C. incrassata*, *F. caperata* et *U. florida* (Tableau 12).

D'une part, la méthode adaptée du challenge test de la Pharmacopée Européenne a mis en évidence que les trois extraits et l'acide usnique commercial, aux concentrations testées (comprises entre 0,5 et 1 mg/mL), ne présentent pas d'activité sur les bactéries à Gram négatif (*P. aeruginosa* et *E. coli*). En revanche, des activités intéressantes ont été observées sur *S. aureus*, *C. albicans* et *A. brasiliensis*. En effet, pour chacune des souches microbiennes testées, au moins un extrait sur les trois permet d'obtenir une activité proche de celle de l'acide usnique, ainsi qu'une activité supérieure ou similaire à celle du Phénonip® (pour des concentrations 8 à 16 fois plus faibles). L'extrait de *C. incrassata*, en particulier, possède une activité remarquable sur *S. aureus*. En effet, il induit un effet bactéricide dès le temps zéro, contrairement aux autres extraits, à l'acide usnique et au Phénonip®. L'extrait de *C. incrassata* étant le moins riche en acide usnique, celui-ci contient donc probablement d'autres composés responsables de l'activité bactéricide rapide sur *S. aureus*.

D'autre part, des tests en microplaques ont permis de déterminer les pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne des extraits testés à plusieurs concentrations (comprises entre 25 et 40 µg/mL). Les résultats obtenus indiquent que la concentration minimale inhibitrice de l'extrait d'*U. florida* est inférieure à celle du Phénonip®. Enfin, des tests par bioautographie effectués sur *S. aureus* ont mis en évidence et confirmé, pour chaque extrait brut, la présence de plusieurs composés antibactériens dont l'acide usnique.

Tableau 12 : Informations apportées par les différentes techniques mises en œuvre pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits.

Méthode	Informations apportées
Méthode adaptée du challenge test	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'activité des extraits sur les bactéries à Gram négatif. - Activité bactéricide rapide de l'extrait de <i>C. incrassata</i>. - Activité microbicide proche de celle de l'acide usnique et proche ou supérieure à celle du Phénonip®.
Test en microplaques	<ul style="list-style-type: none"> - Activité bactériostatique des extraits plus importante que celle du Phénonip® mais inférieure à celle de la ciprofloxacine.
Test par bioautographie	<ul style="list-style-type: none"> - Mise en évidence de plusieurs composés actifs sur <i>S. aureus</i> dans chacun des trois extraits.

L'objectif de ce travail étant d'isoler et d'identifier des composés antibactériens, une investigation phytochimique a ensuite été réalisée sur les extraits par fractionnement bioguidé. Cette méthode, associant les techniques chromatographiques aux tests d'activité antibactérienne par bioautographie sur *S. aureus*, a permis d'accéder aux métabolites secondaires actifs. Cette partie décrira l'isolement et la purification des composés actifs et des composés majoritaires des extraits.

IV. FRACTIONNEMENT BIOGUIDE DES EXTRAITS

IV.1. Purification de l'extrait de *C. incrassata* Flörke

Dans un premier temps, la reprise de l'extrait brut sec par l'acétone a conduit à la formation d'un précipité (CiP). Après centrifugation, ce dernier a été obtenu avec une masse de 790 mg, soit plus de 50 % des composés extraits.

Le précipité CiP contenant majoritairement les acides squamatique et thamnolique a été testé par bioautographie. Aucune activité n'a été détectée sur *S. aureus*, cependant la couleur orange de cette fraction a attiré notre attention. Sa purification a donc été entreprise afin d'isoler le composé Ci7 responsable de cette coloration et supposé être un pigment présent dans les apothécies de *C. incrassata* (Figure 88).

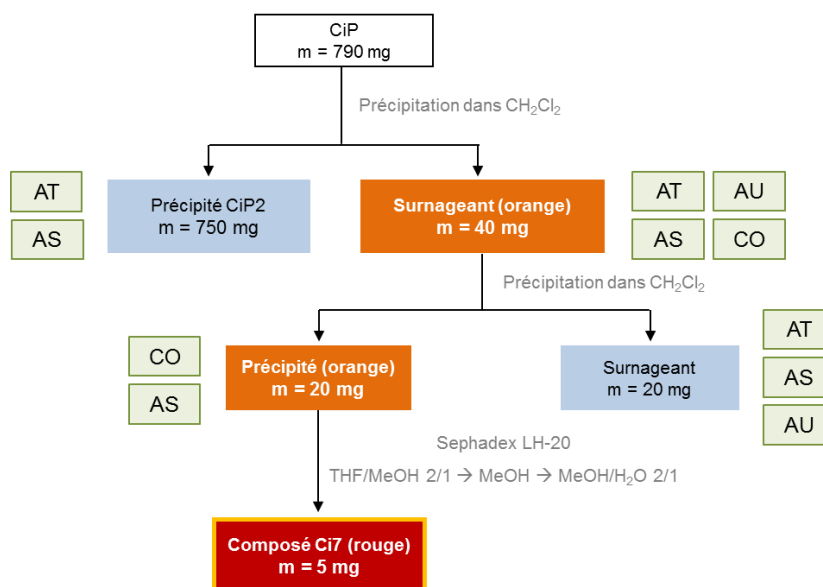


Figure 88 : Etapes de purification du composé Ci7 à partir du précipité CiP. AU : acide usnique ; AT : acide thamnolique ; AS : acide squamatique ; CO : composé orange.

La reprise de CiP par le dichlorométhane a conduit à l'obtention du précipité (CiP2) et d'un surnageant orange, contenant les acides squamatique et thamnolique, ainsi qu'un composé orange

dans le visible et des traces d'acide usnique. Après évaporation à sec, le résidu du surnageant a été repris par du dichlorométhane. Un précipité, formé d'un pigment rouge-orange et d'acide squamatique, a été obtenu. L'analyse par CCM du surnageant a révélé la présence des deux depsides accompagnés d'acide usnique. La purification du précipité et l'analyse des composés obtenus n'ont pas permis la caractérisation du pigment rouge-orange présent dans ce lichen.

Le précipité CiP2 a été repris par de l'acétate d'éthyle à chaud pour donner, après centrifugation, un précipité correspondant au composé Ci8 (585 mg).

Le fractionnement a ensuite été effectué sur le résidu obtenu après évaporation du surnageant de l'extrait. Dans un premier temps, une purification par Chromatographie Liquide Moyenne Pression (CLMP) en phase inverse a conduit à l'obtention de 18 fractions dont quatre correspondent à des composés purs (Ci1 à Ci3, et Ci5). Un test d'activité antibactérienne par bioautographie a ensuite été réalisé sur les fractions obtenues afin de repérer d'éventuels composés actifs. L'ensemble des composés Ci1 à Ci3 et Ci5, ainsi que des métabolites présents dans les fractions notées CiS2 et CiS18 ont montré une activité vis-à-vis de *S. aureus*. Ces dernières ont été traitées par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) préparative dans les éluants appropriés, afin de récupérer les composés actifs (Ci4 et Ci6) (Figure 89).

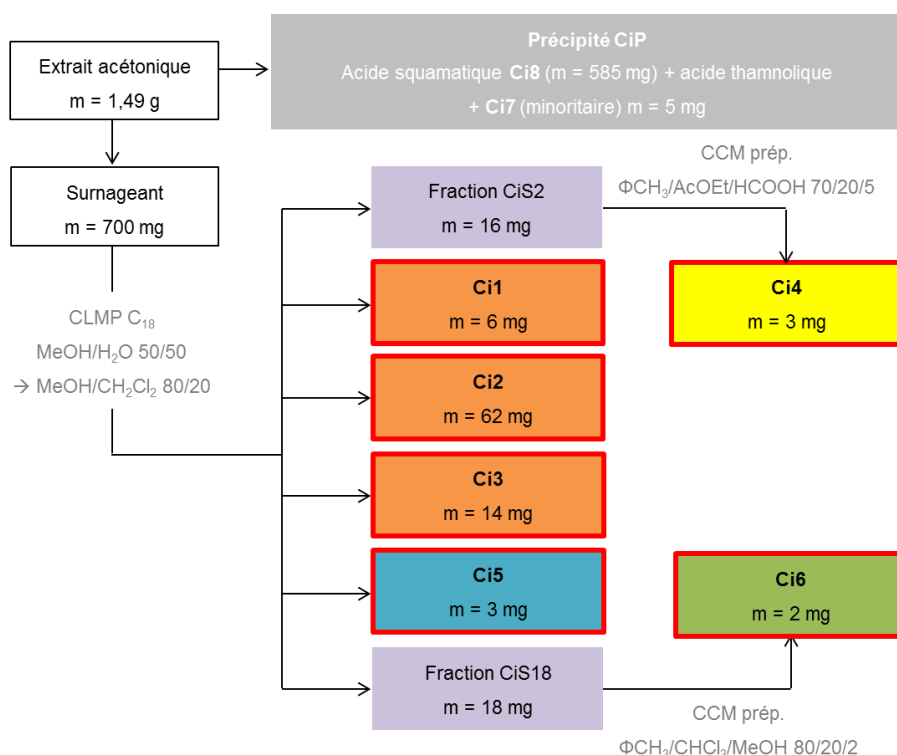


Figure 89 : Etapes de purification des composés obtenus à partir de l'extrait acétonique de *C. incrassata*. Les composés actifs par bioautographie sont encadrés en rouge.

IV.1.1. Métabolites isolés

Au total, huit métabolites secondaires ont été isolés à partir de l'extrait acétonique de *Cladonia incrassata* :

- Les acides subdidymique (Ci1), didymique (Ci2) et condidymique (Ci3)
- L'acide (-)-usnique (Ci4)
- L'acide prasinique (Ci5)
- La cladoxanthone A (composé nouveau) (Ci6)
- Le composé Ci7
- L'acide squamatique (Ci8)

L'identification structurale des composés a été effectuée par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ^1H), et chaque fois que nécessaire, par RMN du carbone (RMN ^{13}C) ainsi que par des expérimentations RMN bidimensionnelles telles que COSY, HMQC et HMBC. Des analyses par Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR) ont également été réalisées. L'identification structurale des différents métabolites isolés, classés par famille, est décrite ci-après. La plupart de ces composés a fait l'objet d'une publication dans le journal *Planta Medica* (Dieu *et al.*, 2014).

IV.1.1.1. Les dibenzofuranes et l'acide usnique

Trois dibenzofuranes ainsi que l'acide (-)-usnique ont été isolés de l'extrait acétonique de *C. incrassata*. Les acides didymique, subdidymique et condidymique ont des structures très proches, ce qui explique leurs spectres UV identiques observés lors de l'analyse par CLHP-UVBD. La seule différence entre eux se situe au niveau de la longueur des chaînes carbonées qu'ils portent.

Composé Ci1

Seuls 6 mg de ce composé ont été isolés, ce qui représente environ 0,03 % du poids sec du lichen. Son spectre de masse haute résolution met en évidence un ion moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 343,1544 correspondant à la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_5$.

En RMN ^1H , le signal caractéristique d'un groupement méthoxy à 3,86 ppm est observé, accompagné de deux doublets à 6,76 et 6,95 ppm intégrant chacun pour un proton et indiquant la présence de deux protons aromatiques positionnés en *meta* l'un de l'autre ($J = 2,2$ Hz). Un singulet à 6,86 ppm met en évidence la présence d'un proton aromatique porté par un second cycle. Aussi, plusieurs signaux indiquent la présence de protons aliphatiques : des multiplets à 3,15 ; 3,01 ; 1,66 et 1,68 ppm (4 x CH_2), ainsi que deux triplets à 1,00 et 1,02 ppm (2 x CH_3). La RMN ^{13}C confirme la présence

d'un carbone portant un groupement méthoxy à 56,2 ppm et d'une fonction carbonyle à 174,0 ppm. Des déplacements correspondant à 5 carbones quaternaires C-liés, à 4 carbones quaternaires O-liés et à trois carbones aromatiques sont mis en évidence. Enfin, 4 méthylènes et deux groupements méthyle indiquent la présence de deux chaînes aliphatiques sur la structure.

Les analyses par RMN bidimensionnelle (COSY, HMQC et HMBC) ont été effectuées afin de déterminer la structure du composé. L'examen du spectre HMBC permet notamment de distinguer l'environnement respectif des protons aromatiques. Le proton à 6,86 ppm appartenant au noyau A corrèle avec les carbones C-2 (δ 119,3), C-3 (δ 156,5), C-9 (δ 159,7), C-12 (δ 117,5) et C-13 (δ 174,0). Celui à 6,76 ppm, présent sur le noyau B, corrèle avec les carbones C-1'' (δ 39,7), C-5 (δ 95,1), C-6 (δ 160,2) et C-11 (δ 117,1). Le proton aromatique à 6,95 ppm corrèle avec les carbones C-7 (δ 114,4), C-10 (δ 159,9) et C-11 (δ 117,1). Enfin, le proton (δ 3,86) du groupement méthoxy est couplé avec le C-6 (δ 160,2) (Figure 90).

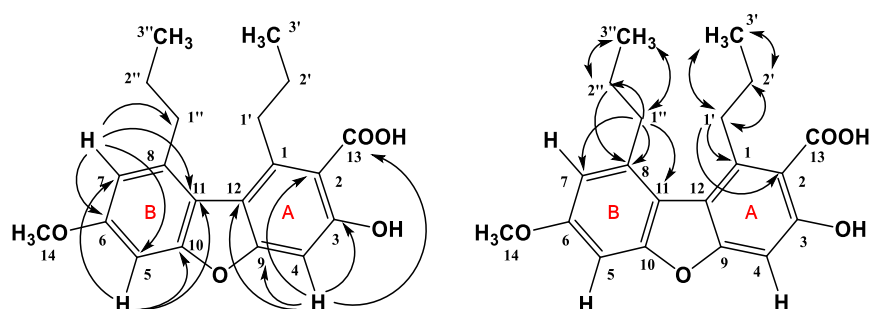


Figure 90 : Corrélations observées en HMBC pour les protons aromatiques (à gauche) et pour les protons des chaînes latérales (à droite) du composé Ci1.

L'enchaînement des carbones des chaînes a également été confirmé par HMBC. La première chaîne latérale montre une corrélation entre du groupement méthyle $\text{CH}_3\text{-3'}$ (δ 1,00) avec les carbones C-2' (δ 26,5) et C-1' (δ 35,9). Le méthylène $\text{CH}_2\text{-2'}$ (δ 1,66) est corrélé avec les carbones C-3' (δ 14,1) et C-1' (δ 35,9). Le méthylène $\text{CH}_2\text{-1'}$ (δ 3,15) est couplé avec le C-2' (δ 26,5), le C-3' (δ 14,1), le C-1 (δ 137,6) et le C-2 (δ 119,3), ce qui permet de rattacher cette chaîne latérale au noyau A. La seconde chaîne latérale est composée d'un groupe méthyle $\text{CH}_3\text{-3''}$ (δ 1,02) qui corrèle avec le C-1'' (δ 39,7) et le C-2'' (δ 26,4). Ce dernier $\text{CH}_2\text{-2''}$ (δ 1,68) est corrélé avec le C-3'' (δ 14,1) et le C-8 (δ 139,1). Enfin, le méthylène $\text{CH}_2\text{-1''}$ (δ 3,01) est couplé avec le C-3'' (δ 14,1), le C-2'' (δ 26,4), le C-7 (δ 114,4), le C-8 (δ 139,1) et le C-11 (δ 117,1) du noyau B.

Les déplacements chimiques sont comparables à ceux de l'**acide subdidymique** (Elix et Kennedy, 1985). Les données de la littérature pour ce composé se limitent à la RMN ^1H . Les déplacements chimiques et corrélations obtenus en ^{13}C RMN et en RMN bidimensionnelle (HMQC, HMBC et COSY) au cours de ce travail permettent donc d'en compléter les données structurales.

Composé Ci2

Un peu plus de 60 mg de ce composé ont été isolés, soit environ 0,3 % de la masse sèche du lichen. Le spectre de masse haute résolution fait apparaître un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 369,1705 correspondant à la formule brute $C_{22}H_{26}O_5$. La masse de ce composé diffère de celle de l'acide subdidymique (Ci1) par deux carbones et quatre hydrogènes, suggérant la présence de deux motifs CH_2 supplémentaires au niveau des chaînes latérales. Contrairement à l'acide subdidymique (RMN réalisée dans le méthanol deutéré), le composé Ci2 a été analysé dans le chloroforme deutéré et le signal caractéristique d'une fonction hydroxyle à 10,98 ppm a ainsi pu être observé.

L'identification structurale a été complétée par des analyses par RMN bidimensionnelle (1H - 1H COSY, HMQC et HMBC) qui ont permis de déterminer la structure du composé, et en particulier la position des chaînes latérales sur les cycles ainsi que l'enchaînement de leurs carbones (Figure 91).

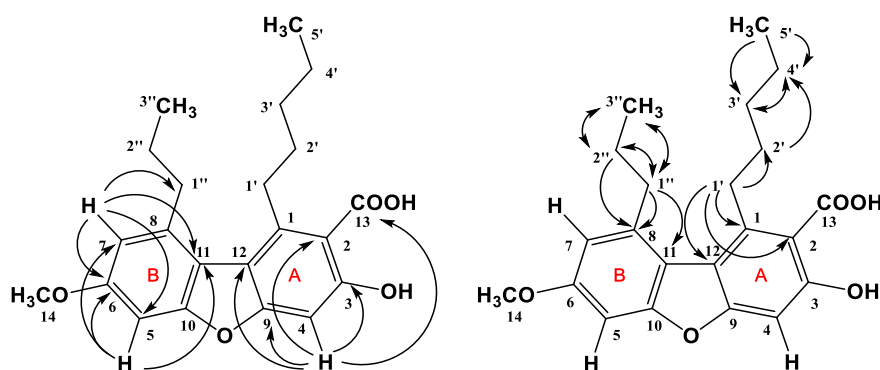


Figure 91 : Corrélatons observées en HMBC pour les protons aromatiques (à gauche) et pour les protons des chaînes latérales (à droite) du composé Ci2.

L'expérimentation HMBC montre des corrélations entre un groupe méthyle CH_3-5' (δ 0,87) et les carbones $C-4'$ (δ 22,6) et le $C-3'$ (δ 31,6). Le méthylène CH_2-4' (δ 1,33) est corrélé avec le carbone $C-3'$ (δ 31,6). Le méthylène CH_2-3' (δ 1,39) est corrélé avec le $C-4'$ (δ 22,6) et le méthylène CH_2-2' (δ 1,60) est couplé avec le $C-4'$ (δ 22,6). Enfin, le méthylène CH_2-1' (δ 3,55) corrèle avec les carbones $C-2'$ (δ 32,3), $C-1$ (δ 143,3), $C-2$ (δ 107,5), et $C-12$ (δ 119,4), ce qui permet de rattacher cette chaîne latérale au noyau A. La seconde chaîne est composée d'un groupe méthyle CH_3-3'' (δ 1,02) corrélé avec les carbones $C-2''$ (δ 24,7) et $C-1''$ (δ 39,3), du méthylène CH_2-2'' (δ 1,72) corrélé avec les carbones $C-3''$ (δ 13,8), $C-1''$ (δ 39,3), et $C-8$ (δ 138,4), et du méthylène CH_2-1'' (δ 3,04) couplé avec les carbones $C-3''$ (δ 13,8), $C-2''$ (δ 24,7), $C-8$ (δ 138,4), et $C-11$ (δ 115,7).

Les déplacements chimiques sont comparables à ceux de l'acide didymique (ou acide incrassatique). Les données disponibles dans la littérature pour ce composé sont la RMN 1H et ^{13}C

(Carvalho et Sargent, 1984). Les corrélations obtenues RMN bidimensionnelle (HMQC, HMBC et COSY) au cours de ce travail permettent d'appuyer la structure proposée.

Un dosage de ce composé a été effectué par CLHP-UVBD et a permis de déterminer son pourcentage dans l'extrait acétonique ainsi que dans le lichen (Tableau 13).

Tableau 13 : Pourcentages massiques dans l'extrait et le lichen sec obtenus pour l'acide didymique.

% dans l'extrait	% dans le lichen
5,4 ± 0,1 %	0,43 ± 0,01 %

Le pourcentage en acide didymique dans l'extrait de *C. incrassata* est près de deux fois plus élevé que celui en acide usnique obtenu précédemment (3 %). En revanche, son pourcentage massique dans le lichen sec est deux fois plus faible que celui déterminé par Huovinen *et al.* sur un échantillon récolté en Suède (Huovinen *et al.*, 1989).

Composé Ci3

Seulement 14 mg de ce composé ont été isolés, ce qui représente 0,07 % du poids sec du lichen. Le spectre de masse haute résolution fait apparaître un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 397,2020 correspondant à la formule brute $C_{24}H_{30}O_5$. La masse de ce composé met en évidence la présence de deux carbones et quatre hydrogènes supplémentaires par rapport à l'acide didymique (Ci2), suggérant ainsi une élongation des chaînes latérales.

Des analyses par RMN bidimensionnelle (1H - 1H COSY, HMQC et HMBC) ont permis de déterminer la structure du composé, et en particulier le positionnement des chaînes latérales sur les cycles ainsi que l'enchaînement de leurs carbones (Figure 92). D'après l'expérimentation HMBC, la première chaîne latérale montre des corrélations entre le groupe méthyle CH_3-5' (δ 0,87) et les carbones C-4' (δ 22,6) et C-3' (δ 31,6). Le méthylène CH_2-4' (δ 1,30-1,39) est corrélé avec les carbones C-5' (δ 14,0) et C-3' (δ 31,6). Le méthylène CH_2-3' (δ 1,30-1,39) est corrélé avec le carbone C-4' (δ 22,6). Enfin, le méthylène CH_2-2' (δ 1,60) est couplé avec les carbones C-4' (δ 22,6) et C-1 (δ 143,3), et le méthylène CH_2-1' (δ 3,55) corrèle avec les carbones C-2' (δ 32,4), C-1 (δ 143,3), C-2 (δ 107,5), et C-12 (δ 119,4), ce qui permet de rattacher cette première chaîne latérale au cycle A. La seconde chaîne est composée d'un groupe méthyle CH_3-5'' (δ 0,91) couplé avec les carbones C-4'' (δ 22,6) et C-3'' (δ 31,3), du méthylène CH_2-4'' (δ 1,30-1,39) corrélé avec les carbones C-5'' (δ 13,8) et C-3'' (δ 31,3). Le méthylène CH_2-3'' (δ 1,30-1,39) est corrélé avec le carbone C-4'' (δ 22,6), le méthylène CH_2-2'' (δ 1,68) est corrélé avec le carbone C-8 (δ 138,6). Enfin, le méthylène CH_2-1'' (δ 3,06) est couplé avec les carbones C-3'' (δ 31,3), C-7 (δ 113,6), C-8 (δ 138,6), et C-11 (δ 115,7).

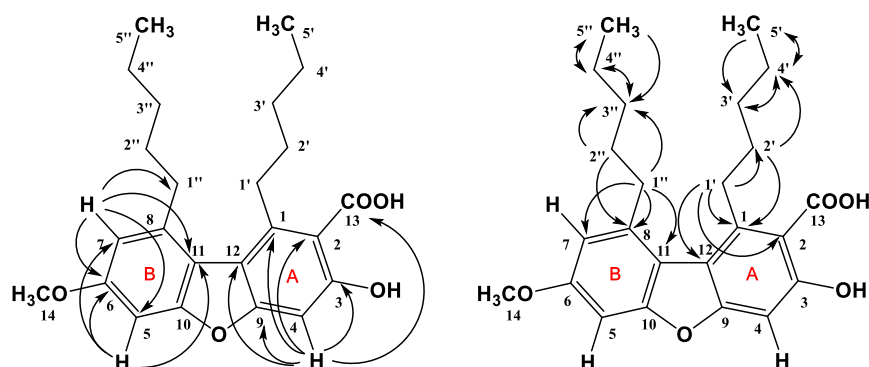


Figure 92 : Principales corrélations observées en HMBC et en COSY pour le composé Ci3.

Les déplacements chimiques sont comparables à ceux de l'**acide condidymique**. Les résultats obtenus par les différentes expérimentations RMN (^{13}C , HMQC, HMBC et COSY) permettent de compléter les données concernant ce composé puisque, à notre connaissance, seuls les déplacements chimiques en RMN ^1H sont disponibles dans la littérature (Chester et Elix, 1981).

Composé Ci4

Lors de la purification, seule une fraction contenant ce composé a été traitée. C'est la raison pour laquelle une faible quantité (3 mg) en a été isolée. Le spectre de masse haute résolution met en évidence un ion moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 343,0818 correspondant à la formule brute $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$.

Ce composé a été premièrement identifié par CCM et CLHP-UVBD. Une analyse par RMN ^1H a ensuite été réalisée afin de confirmer la structure du composé. Sur le spectre, les signaux caractéristiques de trois fonctions hydroxyles à 18,83 ; 13,31 et 11,03 ppm sont observés. Ils sont accompagnés d'un singulet à 5,98 ppm intégrant pour un proton, ainsi que de quatre singulets (2,68 ; 2,67 ; 2,11 et 1,76 ppm) qui intègrent chacun pour trois protons et signalent la présence de groupements méthyle. Ces déplacements sont en tous points comparables à ceux décrits dans la littérature pour l'acide usnique, fréquemment retrouvé dans les lichens (Ivanova *et al.*, 2010). Son pouvoir rotatoire a également été déterminé ($[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -443$). Le composé Ci4 est donc l'**acide (-)-usnique**.

IV.1.1.2. Les depsides

Deux depsides ont été isolés à partir de l'extrait de *C. incrassata* : les acides prasinique et squamatique. Un troisième depside a également été identifié par comparaison avec les témoins à disposition au laboratoire : l'acide thamnolique (Figure 93).

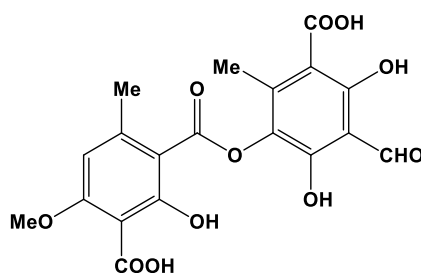


Figure 93 : Structure de l'acide thamnolique.

Composé Ci5

Seuls 3 mg de ce composé ont été isolés à partir de l'extrait acétonique de *C. incrassata*. Son spectre de masse haute résolution met en évidence un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 499,2697 correspondant à la formule brute $C_{29}H_{40}O_7$.

En RMN 1H , les signaux caractéristiques d'un groupement méthoxy à 3,83 ppm et d'une fonction hydroxyle à 11,32 ppm sont observés, accompagnés de deux doublets à 6,68 et 6,55 ppm intégrant chacun pour un proton et indiquant la présence de deux protons aromatiques positionnés en *meta* l'un de l'autre ($J = 2,3$ Hz). Deux autres doublets à 6,34 et 6,32 ppm mettent en évidence la présence de deux protons aromatiques portés par un second cycle ($J = 2,4$ Hz). Aussi, plusieurs multiplets entre 2,84 et 1,23 ppm intégrant pour vingt-quatre protons ainsi que deux triplets intégrant pour trois protons à 0,87 et 0,88 ppm indiquent la présence de deux chaînes aliphatiques. Les déplacements chimiques observés en RMN 1H sont comparables à ceux de l'**acide prasinique** (ou superlatolique) (Elix *et al.*, 1984).

La RMN ^{13}C confirme la structure avec la présence d'un carbone portant un groupement méthoxy à 55,6 ppm et en révélant celle de deux fonctions carbonyle à 174,7 et 171,3 ppm. Des déplacements correspondant à quatre carbones quaternaires C-liés et à quatre carbones quaternaires O-liés sont mis en évidence. Enfin, quatre carbones aromatiques porteurs de protons et quatorze carbones aliphatiques sont repérés. Cette dernière observation suggère la présence de deux chaînes aliphatiques en C_7H_{15} sur les cycles aromatiques.

Les analyses par RMN bidimensionnelle ont été effectuées afin de confirmer la structure du composé. Les corrélations observées en HMQC et HMBC permettent de conclure que les protons à 6,68 et 6,55 ppm sont respectivement en positions 5 et 3, et que les protons à 6,34 et 6,32 ppm sont en positions 5' et 3' respectivement, contrairement à ce qui a été précédemment décrit dans la littérature (positions inversées) (Huneck et Yoshimura, 1996) (Figure 94).

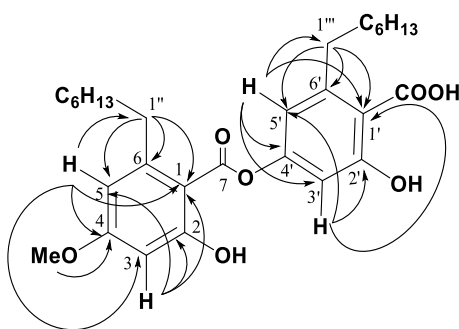


Figure 94 : Principales corrélations proton-carbone longue distance observées pour le composé Ci5.

Le proton aromatique à 6,68 ppm corrèle avec les carbones C-1'' (δ 34,1), C-1 (δ 116,4), C-3 (δ 105,0) et C-4 (δ 162,4). Le proton aromatique à 6,55 ppm corrèle avec les carbones C-1 (δ 116,4), C-2 (δ 154,2) et C-5 (δ 112,8). Le proton aromatique à 6,34 ppm corrèle avec les carbones C-1''' (δ 36,7), C-1' (δ 104,8), C-3' (δ 102,8) et le C-4' (δ 162,7). Enfin, le proton aromatique à 6,32 ppm est couplé avec le C-1' (δ 104,8), le C-2' (δ 166,2) et le C-5' (δ 111,3).

Composé Ci8

L'**acide squamatique** (Figure 95) est le constituant majoritaire du précipité CiP, dont 585 mg ont été isolés. Son identification a été effectuée par comparaison avec des témoins disponibles au laboratoire par analyses en CCM et CLHP-UVBD, ainsi que par RMN ^1H .

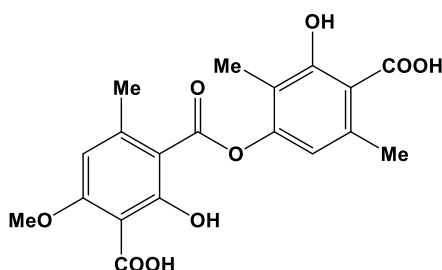


Figure 95 : Structure de l'acide squamatique isolé de *C. incrassata*.

IV.1.1.3. Une xanthone nouvelle : la cladoxanthone A (Ci6)

Ce composé, obtenu sous forme de poudre jaune, est largement minoritaire dans l'extrait de *C. incrassata* puisque seulement 2 mg ont été isolés. Son spectre de masse haute résolution met en évidence un ion moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 342,9336 correspondant à la formule brute $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{O}_4\text{Cl}_3$. De plus, l'amas isotopique observé sur le spectre confirme la présence de trois atomes de chlore dans la molécule.

Le spectre RMN ^{13}C montre la présence de dix carbones aromatiques quaternaires, deux aromatiques tertiaires, un groupement cétone et un groupe méthyle. L'analyse RMN ^1H révèle deux protons aromatiques non couplés, deux fonctions hydroxyles et un proton d'un méthyle, attribués à leurs carbones respectifs par une expérimentation HMQC (Tableau 14).

Tableau 14 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz) pour la cladonanthone A (dans CDCl_3).

no.	^1H	^{13}C	HMBC
1		156,2 C	
2		115,2 C	
3	7,80 s	136,6 CH	C-1, C-2, C-4, C-4a
4		111,2 C	
5		141,2 C	
6		127,9 C	
7		133,7 C	
8	7,73 br s	117,0 CH	C-6, 7-CH ₃ , C-9, C-10a
9		181,2 C	
4a		149,5 C	
8a		118,4 C	
9a		109,7 C	
10a		143,0 C	
OH-1	13,16 s		C-1, C-2, C-9a
OH-5	6,09 s		
CH ₃ -7	2,51 br s	20,2 CH ₃	C-6, C-7, C-8

s : singulet ; br s : singulet élargi.

Les corrélations HMBC observées pour l'hydroxyle OH-1 (δ 13,16) avec les carbones C-9a (δ 109,7), C-2 (δ 115,2) et C-1 (δ 156,2), et pour le proton H-8 à 7,80 ppm avec les carbones C-4 (δ 111,2), C-2 (δ 115,2), C-4a (δ 149,5) et C-1 (δ 156,2), indiquent clairement leurs positions 1 et 3 respectives sur le même cycle aromatique (Figure 96 et Figure 97).

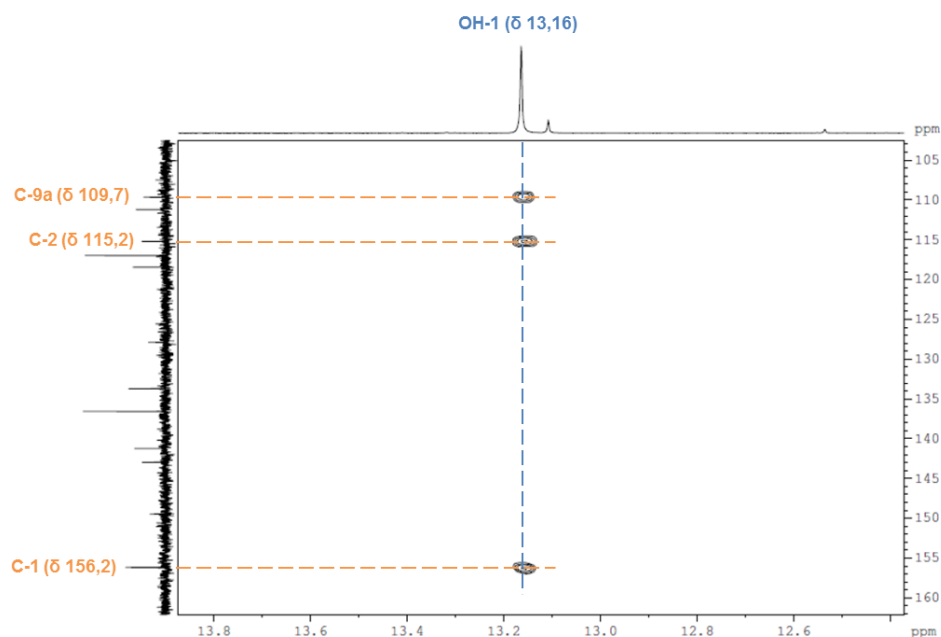


Figure 96 : Corrélations proton-carbone longue distance observées pour le OH-1.

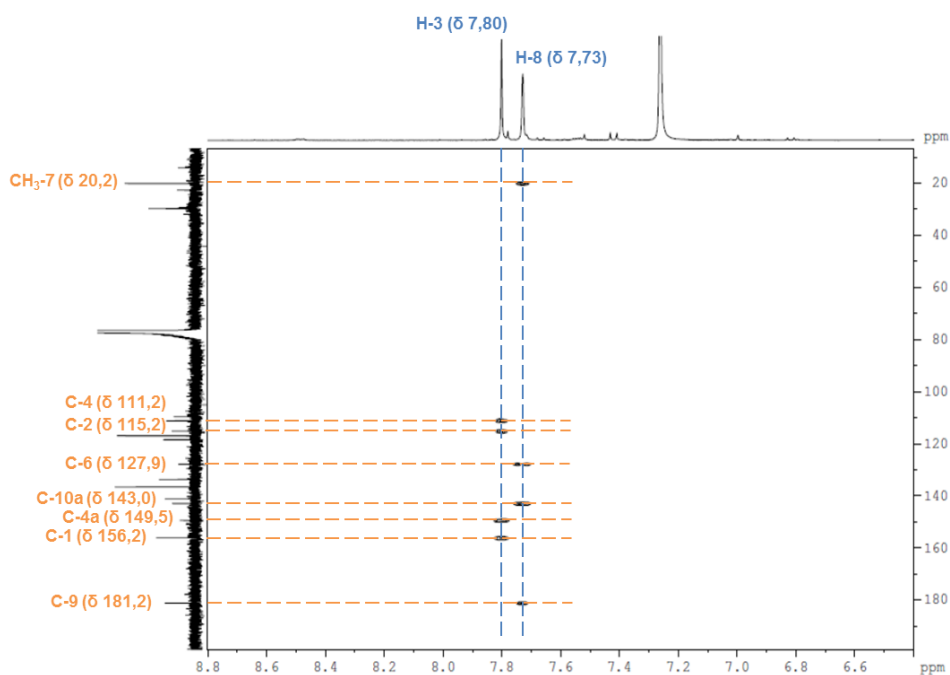


Figure 97 : Corrélations proton-carbone longue distance observées pour les protons H-3 et H-8.

L'expérimentation COSY montre des corrélations entre le proton à 7,73 ppm et les protons du méthyle à 2,51 ppm ce qui confirme leur proximité et leur position sur un second cycle aromatique. De plus, l'analyse HMBC (Figure 97 et Figure 98) révèle en particulier la corrélation entre le proton H-3 à 7,73 ppm et le carbonyle C-9 (δ 181,2) confirmant ainsi la position de ce proton en C-8.

Pour le groupement méthyle en position 7, l'expérimentation HMBC met en évidence trois corrélations cohérentes avec celles généralement observées pour les méthyle aromatiques (Micheletti *et al.*, 2011) (Figure 98 et Figure 99).

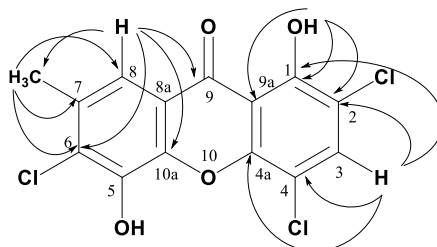


Figure 98 : Structure du composé Ci6 et corrélations longue distance proton-carbone observées (HMBC).

Enfin, les déplacements chimiques des C-5 (δ 141,2) et C-6 (δ 127,9) sont en accord avec ceux de carbones substitués respectivement par un hydroxyle et un chlore.

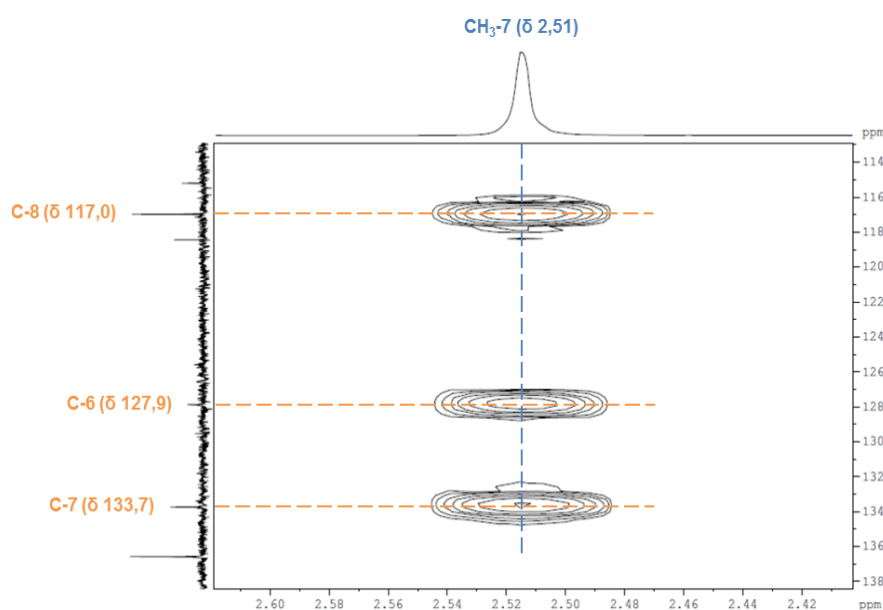


Figure 99 : Corrélations proton-carbone longue distance observées pour les protons CH₃-7.

La structure proposée pour Ci6 correspond à un composé nouveau, la 1,5-dihydroxy-2,4,6-trichloro-7-méthylxanthone, appelée **cladoxanthone A** (Figure 98).

Le groupement méthyle en position 7 est une originalité structurale pour une xanthone ; en effet, ce substituant est très fréquemment présent en position 8, par exemple dans les lichexanthones, mais n'est jamais retrouvé en position 7 (Huneck et Yoshimura, 1996). C'est pourquoi, lors de l'analyse structurale, l'interprétation des spectres HMBC en particulier a été effectuée en tenant compte des deux hypothèses suivantes.

- **Hypothèse 1 : Groupement méthyle en position 8 et proton aromatique en position 7.**

En considérant le groupement méthyle en position 8, comme c'est le cas de la majorité des xanthones, les corrélations HMBC attendues sont celles décrites sur la Figure 100A (Micheletti *et al.*, 2011). Cependant, les corrélations observées dans notre cas sont différentes (figure 100B). En effet, aucun couplage n'est observé avec le carbone C-8a ; de plus, l'intensité de la tâche de corrélation avec le carbone C-6 suggère un couplage au travers de 3 liaisons ($^3J_{CH}$) et non au travers de 4 liaisons ($^4J_{CH}$).

En considérant le proton en position 7, les corrélations HMBC attendues sont celles présentées sur la figure 100C (Hu *et al.*, 1999). Dans notre cas, les couplages $^3J_{CH}$ avec les carbones C-8a et C-5 ne sont pas observés (figure 100D). Aussi, l'intensité des tâches de corrélation avec les carbones C-9 et C-10a indique des couplages en $^3J_{CH}$ plutôt qu'en $^4J_{CH}$.

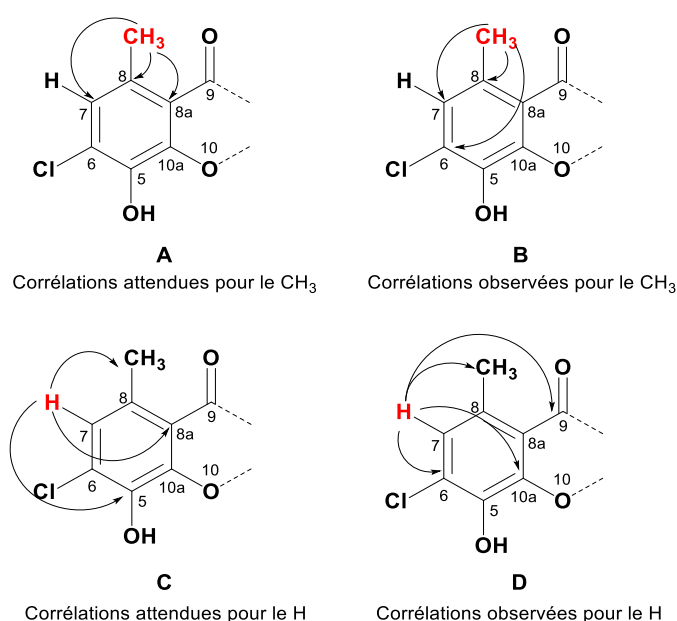


Figure 100 : Corrélations HMBC attendues et observées pour l'hypothèse 1.

Les données obtenues par l'expérimentation HMBC ne soutiennent donc pas l'hypothèse classique d'une xanthone portant un groupement méthyle en position 8.

- **Hypothèse 2 : Groupement méthyle en position 7 et proton aromatique en position 8.**

En considérant le groupement méthyle et le proton en positions 7 et 8 respectivement, comme proposé précédemment, les corrélations HMBC attendues sont celles décrites sur les figures 101A et 101C. Les corrélations observées pour le proton aromatique et le groupement méthyle sont similaires à celles attendues (figures 101B et 101D). Ainsi, les couplages du proton H-8 avec les carbones C-10a, C-9, CH₃-7 et C-6, et du méthyle CH₃-7 avec les carbones C-8, C-7 et C-6, indiquent sans ambiguïté les positions du H-8 et du CH₃-7, contrairement aux autres xanthones décrites dans la littérature.

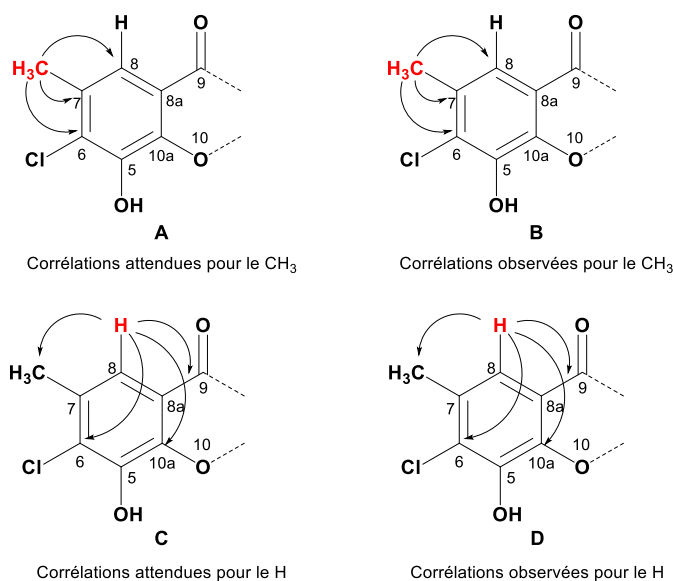


Figure 101 : Corrélations HMBC attendues et observées pour l'hypothèse 2.

Si la structure de la cladoxanthone A est originale, des xanthones atypiques avec le méthyle en position 3, telles que la raveneline, ont déjà été décrites (Masters et Bräse, 2012). Dans une étude antérieure, Elix et Crook suggèrent que la fixation sélective des substituants chlore et méthyle est sous contrôle enzymatique (Elix et Crook, 1992). Cette hypothèse pourrait en partie expliquer la structure originale de la cladoxanthone A par rapport aux xanthones classiquement reportées dans la littérature.

La voie de biogenèse d'une autre xanthone possédant un groupe méthyle en 3, la thioméline, a été étudiée par Elix *et al.* (Elix *et al.*, 1993). Par analogie à la biosynthèse de la raveneline, le schéma proposé fait intervenir un clivage oxydatif de l'intermédiaire anthraquinone, l'islandicine, pour donner une benzophénone. Enfin, une décarboxylation, ainsi que des chlorations et une *O*-méthylation sélectives conduisent à la formation de la thioméline. De la même manière, la voie de biosynthèse de la cladoxanthone A peut être proposée à partir d'une anthraquinone naturelle, la ziganéine (Figure 102). Cette dernière a notamment été identifiée chez un champignon endophytique (*Sporormiella minimoides*) isolé d'une Rubiacée (*Hintonia latiflora*) (Leyte-Lugo *et al.*, 2013). Une coupure oxydative du cycle peut ainsi être envisagée, suivie d'une cyclisation décarboxylative puis de chlorations enzymatiques touchant sélectivement les positions 2, 4 et 6.

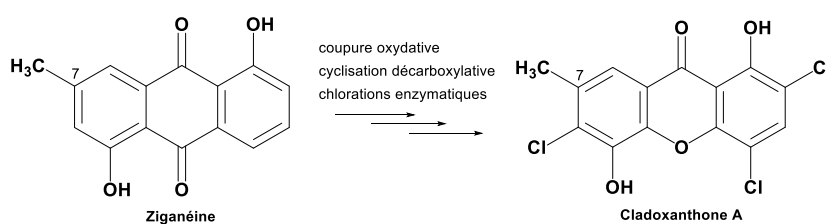


Figure 102 : Voie de biosynthèse proposée pour la cladoxanthone A.

IV.1.1.4. Composé Ci7

À partir de l'extrait acétonique de *C. incrassata*, seulement 5 mg de ce composé ont été isolés. Son spectre de masse haute résolution en impact électronique met en évidence un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 317,0302 correspondant à la formule brute $C_{15}H_{10}O_8$. Cette dernière est cohérente avec la formule brute d'un pigment très fréquemment retrouvé chez les *Cladonia* à apothécies rouges (Huovinen *et al.*, 1989) et déjà identifié chez *C. incrassata* (Kortepeter, 1996) : l'acide rhodocladonique.

Ce composé, responsable de la couleur rouge des apothécies, est décrit chez plusieurs espèces du genre *Cladonia* telles que *C. cristatella* (Castle et Kubsch, 1949) ou *C. diversa* (Osyczka, 2009). Chez *C. bacilliformis* et *C. norvegica*, ce composé est présent dans le thalle, autour des cavités formées par une espèce de mite lichénicole, et serait synthétisé en tant qu'agent antiherbivore pour protéger le thalle lichénique (Timdal, 1989). En 1941, Shibata propose pour ce composé une première structure anthraquinone sur la base d'une structure moléculaire erronée ($C_{17}H_{12}O_9$). Plus tard, Baker et Bullock déterminent la formule moléculaire correcte de l'acide rhodocladonique ($C_{15}H_{10}O_8$) et établissent qu'il s'agit en réalité d'une naphthoquinone (Figure 103) (Baker et Bullock, 1969). En 1983, McLean *et al.* confirment cette structure en analysant sa forme triacétate par cristallographie de rayons X.

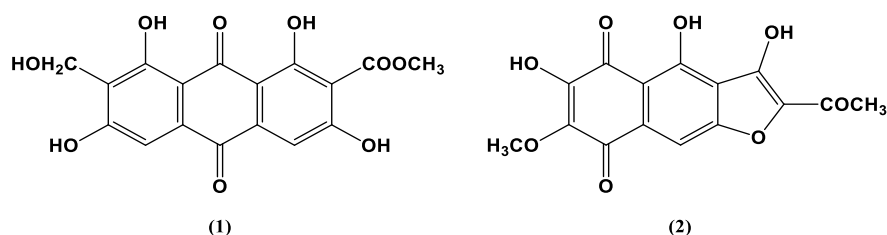


Figure 103 : Structure de l'acide rhodocladonique proposée par Shibata en 1941 (1), et structure modifiée par Baker et Bullock (1969) et confirmée par Mc Lean *et al.* (1983) (2).

La formule obtenue par SMHR pour le composé Ci7 est en accord avec celle de l'acide rhodocladonique, mais au vue de la faible quantité isolée, l'analyse par RMN 1H et ^{13}C n'a pas permis de confirmer que le composé Ci7 correspond bien à ce pigment.

IV.1.2. Discussion sur les composés isolés de *C. incrassata*

L'étude phytochimique menée sur *C. incrassata* a permis d'isoler et d'identifier huit composés appartenant à des familles différentes, dont certains sont déjà connus chez ce lichen. L'acide squamatique est un constituant majoritaire du lichen et il représente, accompagné de l'acide thamnolique, plus de 50 % de la masse sèche de l'extrait. Ces deux depsides sont déjà décrits pour cette espèce (Kortepeter, 1996 ; Hauck *et al.*, 2009a).

Un pigment rouge, supposé être un composé proche de l'acide rhodocladonique, a été isolé. Du fait de la faible masse récupérée, l'identification n'a pas pu être confirmée. Cependant, ce pigment de type naphtoquinone est très fréquemment retrouvé chez les *Cladonia* à apothécies rouges (Huovinen *et al.*, 1989) et a été identifié chez *C. incrassata* (Kortepeter, 1996) ; il ne serait donc pas étonnant qu'il s'agisse bien de ce composé.

L'acide usnique qui représente près de 3 % de l'extrait, a également été isolé et identifié. Il s'agit de l'énantiomère le plus rare chez les lichens, l'acide (-)-usnique, précédemment décrit chez cette espèce (Huovinen *et al.*, 1989). Il est accompagné de trois dibenzofuranes de structures proches : l'acide didymique, l'acide subdidymique et l'acide condidymique, minoritaires. Ces trois dibenzofuranes ont déjà été identifiés chez cette espèce (Huovinen *et al.*, 1989), mais à notre connaissance, ils en sont ici isolés pour la première fois. Ils se différencient uniquement par la longueur de leurs chaînes latérales, ce qui induit des migrations similaires par CCM et des spectres UV identiques. Seule une analyse par CLHP en phase inverse permet de les séparer convenablement avec des temps de rétention bien distincts. La Figure 104 ci-dessous présente le chromatogramme de l'extrait acétonique sur lequel les composés isolés majoritaires ont été repérés.

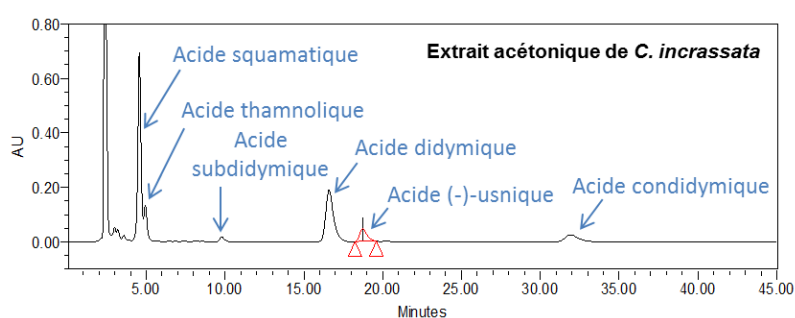


Figure 104 : Repérage, sur le chromatogramme de l'extrait acétonique (à 230 nm), des composés majoritaires isolés à partir de *C. incrassata* (CLHP C18 ; MeOH/H₂O/H₃PO₄ 80/20/0,9 (v/v/v) ; 1 mL/min).

Les analyses RMN effectuées sur ces dibenzofuranes, notamment les expérimentations bidimensionnelles, permettent de compléter leurs données structurales qui se limitent généralement, dans la littérature, à des analyses RMN ¹H et parfois RMN ¹³C.

Le troisième depside identifié chez ce lichen est l'acide prasinique ou superlatolique, possédant de longues chaînes aliphatiques. Ce composé n'est pas décrit dans la littérature chez *Cladonia incrassata* mais a précédemment été isolé d'un autre lichen, *Micarea prasina* (Elix *et al.*, 1984). Il semble donc qu'il soit, dans le cadre de cette étude, identifié et isolé pour la première fois à partir de cette espèce. De plus, les données obtenues en RMN bidimensionnelle, et en particulier en HMBC, permettent de réattribuer les protons aromatiques sur les deux cycles à des positions différentes de celles reportées dans la littérature (Huneck et Yoshimura, 1996).

Un composé nouveau a également été identifié : la cladoxanthone A. Il s'agit d'une xanthone dont la structure, portant un groupement méthyle en position 7, est tout à fait originale au vue des xanthones classiquement décrites. Sans remettre en cause les voies de biosynthèse connues, une voie alternative peut ici être envisagée. Ainsi, un mécanisme de biogenèse est proposé par analogie à celui de la raveneline et de la thioméline, xanthones portant un groupement méthyle en position 3, et dont les voies de biogenèse sont atypiques. Il serait concevable que la cladoxanthone A provienne d'une anthraquinone connue, la ziganéine, précédemment identifiée chez un champignon endophytique (Leyte-Lugo *et al.*, 2013). De même, de nombreuses xanthones sont décrites chez les bactéries et les champignons, dont des chloroxanthones (Master et Bräse, 2012), et une étude reporte la présence d'un champignon lichénicole, *Chaenothecopsis pusilla*, sur un des spécimens de *C. incrassata* récoltés (Tønsberg, 1995). L'origine supposée de la cladoxanthone A pourrait donc être étendue aux organismes capables de coloniser ce lichen, et pas seulement au lichen lui-même.

Enfin, le spécimen de *C. incrassata* étudié au cours de ce travail appartient au chémotype décrit dans la littérature contenant les acides didymique, condidymique, squamatique et usnique, ainsi que des traces d'acide subdidymique (Culberson *et al.*, 1982 ; Kukwa, 2005).

Le second lichen ayant fait l'objet d'une étude phytochimique au cours de ce travail est *Usnea florida* (L.) Weber ex F.H. Wigg. Les travaux menés sur l'extrait acétonique de cette espèce sont décrits ci-après.

IV.2. Purification de l'extrait d'*U. florida* (L.) Weber ex F.H. Wigg.

Comme pour l'extrait de *C. incrassata*, des tests par bioautographie ont été réalisés tout au long de la purification sur les fractions et sous-fractions afin de détecter les éventuels composés actifs sur *S. aureus*. La Figure 105 résume le fractionnement de l'extrait acétonique de manière simplifiée (l'intégralité des étapes de purification est présentée dans la partie Données Expérimentales).

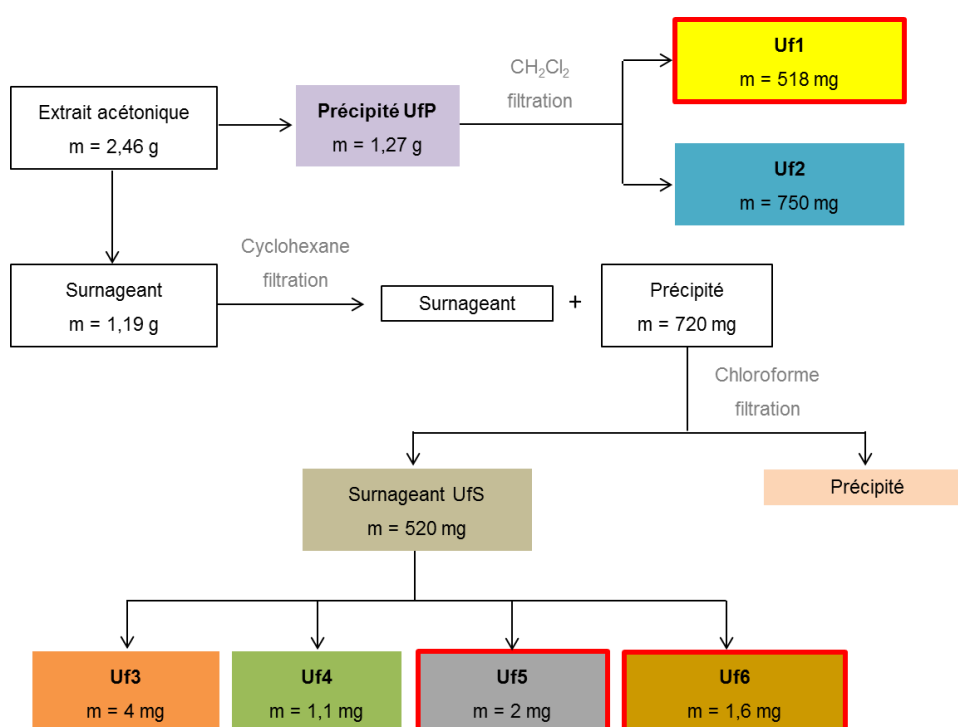


Figure 105 : Schéma simplifié du fractionnement et composés obtenus pour l'extrait d'*U. florida*. Les composés actifs par bioautographie sont encadrés en rouge.

L'extrait brut sec (2,46 g) a été repris par l'acétone pour conduire à la formation d'un précipité (UfP). Après centrifugation, ce dernier a été obtenu avec une masse de 1,27 g ce qui représente environ 50 % des composés extraits. Celui-ci a été repris par du dichlorométhane pour obtenir un surnageant correspondant au composé Uf1, et un précipité formé par le composé Uf2.

Le fractionnement bioguidé du résidu après évaporation du surnageant de l'extrait a ensuite été entrepris, et la mise en œuvre de plusieurs techniques (précipitation dans différents solvants, gel de Sephadex LH-20, CLMP C18, CCM préparative) a conduit à l'obtention de composés minoritaires. Dans

un premier temps, le surnageant a été repris par du cyclohexane, ce qui a conduit à la formation d'un précipité pour lequel une activité a été détectée par bioautographie. Le traitement de ce dernier par du chloroforme a permis l'obtention d'un second précipité et d'un surnageant (Uf5), ce dernier contenant des composés actifs mis en évidence par bioautographie. La fraction Uf5 a été reprise par du méthanol pour former un précipité et un surnageant purifié par CLMP en phase inverse. Sur les onze fractions obtenues, deux contiennent des métabolites actifs sur *S. aureus* par bioautographie et ont été purifiées par CCM préparatives pour donner les composés Uf3 à Uf6.

IV.2.1. Métabolites isolés

Au total, six métabolites, appartenant à des familles structurales différentes, ont été isolés à partir de l'extrait acétonique d'*Usnea florida* :

- L'acide (+)-usnique (Uf1)
- L'acide thamnolique (Uf2)
- Le 5,7-dihydroxy-6-méthylphtalide (Uf3)
- L'acide évernique (Uf4)
- Les acides physodique (Uf5) et 3-hydroxyphysodique (Uf6)

L'identification structurale des différents composés a été effectuée par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ^1H) et par RMN du carbone (RMN ^{13}C), et par des expérimentations RMN bidimensionnelles telles que COSY, HMQC et HMBC, lorsque le produit est en quantité suffisante. Des analyses par Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR) ont également été réalisées sur chacun de composés. L'identification structurale des différents métabolites isolés, classés par famille, est décrite ci-après.

IV.2.1.1. L'acide (+)-usnique (Uf1)

Plus de 500 mg de ce composé ont été récupérés. Le spectre de masse haute résolution met en évidence un ion moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 343,0818 correspondant à la formule brute $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$.

Etant donné que le laboratoire dispose d'un témoin d'acide (+)-usnique commercial, ce composé a été précédemment identifié par CCM et CLHP-UVBD. Une analyse par RMN ^1H a été réalisée afin de confirmer la structure du composé. Sur le spectre, les signaux caractéristiques de trois fonctions hydroxyle à 18,83 ; 13,31 et 11,03 ppm sont observés. Ils sont accompagnés d'un singulet à 5,98 ppm intégrant pour un proton, ainsi que de quatre singulets (2,68 ; 2,67 ; 2,11 et 1,76 ppm) qui intègrent chacun pour trois protons et signalent la présence de groupements méthyle.

Ces déplacements chimiques sont en tous points comparables à ceux décrits dans la littérature pour l'acide usnique (Ivanova *et al.*, 2010). Son pouvoir rotatoire a également été déterminé ($[\alpha]^{24}_D = + 460$). Le composé Uf1 est donc l'**acide (+)-usnique**.

IV.2.1.2. Les depsides

Deux depsides ont été isolés de l'extrait acétonique d'*U. florida*, dont un est largement majoritaire, l'acide thamnolique, et l'autre minoritaire, l'acide évernique.

Composé Uf2

Ce métabolite constitue, avec l'acide (+)-usnique, le précipité UfP. Environ 750 mg ont été isolés et son spectre de masse haute résolution en impact électronique met en évidence un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 419,0620 correspondant à la formule brute $C_{19}H_{16}O_{11}$.

Un échantillon d'acide thamnolique disponible au laboratoire a permis de repérer ce composé par CCM et CLHP-UVBD dans l'extrait acétonique d'*U. florida*.

Une analyse par RMN 1H a été réalisée sur le métabolite Uf2 afin de confirmer sa structure. Sur le spectre, les signaux caractéristiques de deux fonctions hydroxyle à 12,23 ppm, d'un proton aldéhydique à 10,27 ppm et d'un groupement méthoxy à 3,88 ppm sont observés. Ils sont accompagnés d'un singulet à 6,63 ppm intégrant pour un proton, ainsi que de deux fonctions méthyliques aromatiques (2,45 et 2,50 ppm). Ces déplacements sont en tous points comparables à ceux décrits dans la littérature pour l'**acide thamnolique** (Vila *et al.*, 2011).

Composé Uf4

Environ 1 mg de ce composé a été récupéré. Le spectre de masse haute résolution met en évidence un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 331,0825 correspondant à la formule brute $C_{17}H_{16}O_7$.

L'analyse par RMN 1H met en évidence les signaux caractéristiques d'une fonction hydroxyle à 12,29 ppm (OH-2), d'une fonction méthoxylique à 3,87 ppm (OCH₃-4) ainsi que deux groupes méthyliques aromatiques à 2,63 et 2,64 ppm (CH₃-6 et CH₃-8'). Quatre doublets à 6,79 ; 6,75 ; 6,46 et 6,40 ppm intégrant chacun pour un proton sont repérés et indiquent la présence de quatre protons aromatiques *meta*-couplés (H-3' et H-5', H-3 et H-5) répartis sur deux cycles. Aussi, le spectre RMN ^{13}C confirme la présence d'un groupement méthoxyle avec un carbone à 56,0 ppm. Des expérimentations en RMN bidimensionnelle (COSY, HMQC et HMBC), non reportées dans la littérature, ont été effectuées afin de confirmer la structure de ce composé (Figure 106).

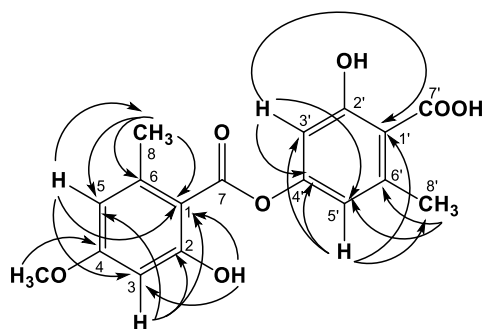


Figure 106 : Corrélations longue distance proton-carbone observées en HMBC pour l'acide évernique.

Les déplacements chimiques obtenus en RMN ^1H et ^{13}C pour le composé Uf4 sont comparables à ceux décrits dans la littérature pour l'**acide évernique** (Rawat *et al.*, 2006).

IV.2.1.3. Les depsidones

A partir d'*U. florida*, deux depsidones ont été isolées et identifiées au cours de ce travail. Il s'agit des acides physodique (Uf5) et 3-hydroxyphysodique (Uf6).

Composé Uf5

Ce composé fait partie des métabolites secondaires isolés de l'extrait d'*U. florida* avec seulement 2 mg de produit isolés. Le spectre de masse haute résolution met en évidence un ion moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 469,1869 correspondant à la formule brute $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_8$.

L'examen du spectre RMN ^1H montre des singulets à 6,80 ; 6,62 et 6,48 ppm signalant la présence de trois protons aromatiques dont deux sont en position *meta* l'un de l'autre ($J = 2$ Hz). Des signaux compris entre 0,88 et 3,97 ppm mettent en évidence la présence de deux CH_3 et neuf CH_2 répartis sur deux chaînes latérales.

Les déplacements chimiques obtenus en RMN ^1H pour le composé Uf5 sont en accord avec ceux décrits dans la littérature pour l'**acide physodique** (Culberson, 1969) (Figure 107).

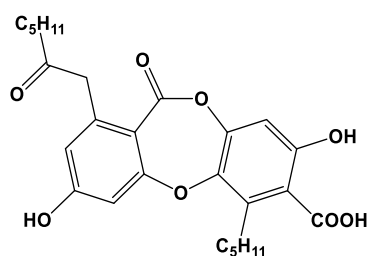


Figure 107 : Structure de l'acide physodique isolé d'*U. florida*.

Composé Uf6

Ce composé est également un métabolite secondaire largement minoritaire dans l'extrait d'*U. florida* avec moins de 2 mg de produit isolés. Le spectre de masse haute résolution met en évidence un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 485,1818 correspondant à la formule brute $C_{26}H_{30}O_9$.

Ce composé a été identifié comme étant l'**acide 3-hydroxyphysodique**, dont la structure est similaire à celle de l'acide physodique mais avec un groupement hydroxyle supplémentaire en position 3 (Figure 108). Les données obtenues par RMN sont comparables à celles de l'acide physodique décrit précédemment avec la présence de deux protons aromatiques à 6,52 et 6,49 ppm ainsi que des signaux compris entre 3,81 et 0,90 ppm correspondant aux protons des chaînes carbonées. Ces déplacements chimiques sont en accord avec ceux reportés dans la littérature pour l'acide 3-hydroxyphysodique (Jones *et al.*, 1976).

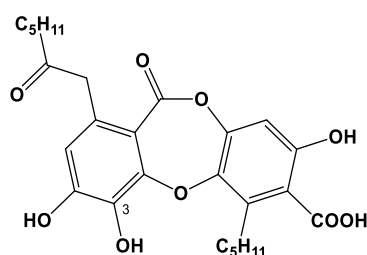


Figure 108 : Structure de l'acide 3-hydroxyphysodique isolé d'*U. florida*.

IV.2.1.4. Le 5,7-dihydroxy-6-méthylphthalide (Uf3)

Le fractionnement de l'extrait acétonique d'*U. florida* a conduit à l'isolement de 4 mg du composé Uf3. Son spectre de masse haute résolution en impact électronique met en évidence un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 179,0349 correspondant à la formule brute $C_9H_8O_4$.

Le spectre RMN 1H met en évidence la présence d'un proton aromatique à 6,46 ppm, d'un groupe méthyle aromatique à 2,07 ppm ainsi que d'un CH_2 intracyclique à 5,19 ppm. De plus, l'analyse du spectre RMN ^{13}C signale la présence d'un carbonyle à 174,3 ppm, et de deux carbones aromatiques O-liés à 156,9 et 165,2 ppm. Toutes ces données sont cohérentes avec celles décrites pour le **5,7-dihydroxy-6-méthylphthalide** (Huneck et Yoshimura, 1996). Les expérimentations en RMN bidimensionnelles (HMBC et COSY) non reportées dans la littérature, viennent conforter cette structure (Figure 109).

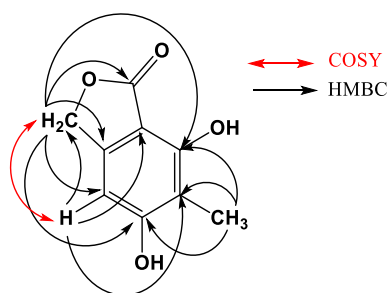


Figure 109 : Corrélations observées en HMBC et COSY pour le 5,7-dihydroxy-6-méthylphtalide.

IV.2.2. Discussion sur les composés isolés d'*U. florida*

L'étude phytochimique réalisée sur *U. florida* a permis d'isoler et d'identifier six composés de familles différentes, et dont certains sont ici décrits pour la première fois dans cette espèce. Les acides (+)-usnique et thamnolique sont les constituants majoritaires du précipité qui représente environ 50 % de la masse sèche de l'extrait et sont déjà décrits chez cette espèce (Fiscus, 1972), dont deux chémotypes principaux sont connus en Europe : les spécimens contenant majoritairement les acides thamnolique et usnique (avec l'acide alectorialique comme substance accessoire), et ceux contenant les acides squamatique et usnique (Clerc, 1984 ; Articus *et al.*, 2002). Le lichen du Limousin étudié au cours de ce travail appartient donc au premier chémotype. Aussi, bien qu'il existe plusieurs sous-espèces et variétés d'*U. florida*, la présence de quatre composés minoritaires est mise ici en évidence pour la première fois chez cette espèce. Il s'agit des acides évernique, physodique, 3-hydroxyphysodique, ainsi que du 5,7-dihydroxy-6-méthylphtalide.

Comme l'acide thamnolique, l'acide évernique est un depside, classiquement retrouvé dans le lichen *Evernia prunastri* (Kosanić *et al.*, 2013) ainsi que dans *Usnea longissima* (Ohmura, 2012). A notre connaissance, ce composé n'a jamais été détecté chez *U. florida* et environ 1 mg a pu être isolé, soit 0,04 % de la masse sèche de l'extrait acétonique. Récemment, il a également été identifié chez une autre espèce du genre *Usnea* récoltée en Inde : *Usnea emidotteries* (Rawat *et al.*, 2006).

Les acides physodique et 3-hydroxyphysodique sont des depsidones, dont 2 mg et 1,6 mg ont été isolés, ce qui correspond respectivement à 0,08 % et 0,065 % de la masse sèche de l'extrait traité. Ces deux composés sont ici décrits pour la première fois dans l'espèce. L'acide physodique est un métabolite présent chez certains lichens du genre *Hypogymnia*, tels que *H. physodes* (Ranković *et al.*, 2014) ou *H. recurva* (Goward *et al.*, 2010) mais également chez *Pseudevernia furfuracea* (Garcia-Junceda *et al.*, 1985 ; Türk *et al.*, 2006). L'acide 3-hydroxyphysodique est lui aussi identifié chez certains lichens du genre *Hypogymnia* comme *H. canadensis* (Goward *et al.*, 2010), *H. tubulosa* (Yilmaz *et al.*, 2005) ou encore *H. schizidiata* (McCune, 2006).

Enfin, 4 mg d'un composé rarement retrouvé chez les lichens, le 5,7-dihydroxy-6-méthylphthalide, ont été isolés soit près de 0,2 % de la masse sèche de l'extrait. Ce métabolite, nouvellement décrit chez *U. florida*, a également été détecté chez un autre lichen, *Calvitimela armeniaca* (Hertel et Andreev, 2003) et isolé d'*Anamylospora pulcherrina* (Huneck et Elix, 1993). Les données obtenues par expérimentations en RMN bidimensionnelle permettent de compléter celles disponibles dans la littérature pour ce composé et d'en conforter la structure.

La Figure 110 ci-dessous présente le chromatogramme de l'extrait acétonique d'*Usnea florida* sur lequel les composés isolés majoritaires ont été repérés.

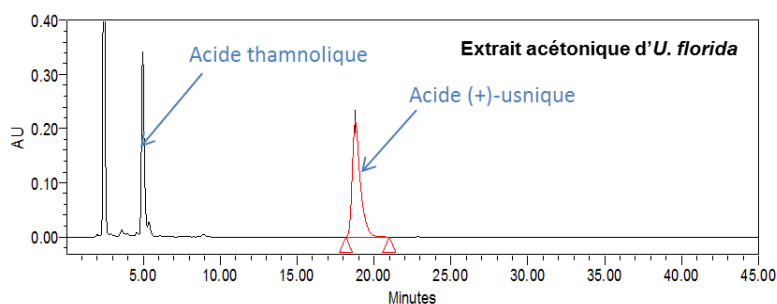


Figure 110 : Repérage, sur le chromatogramme de l'extrait acétonique (à 230 nm), des composés majoritaires isolés à partir d'*U. florida* (CLHP C18 ; MeOH/H₂O/H₃PO₄ 80/20/0,9 (v/v/v) ; 1 mL/min).

Le troisième lichen ayant fait l'objet d'une étude phytochimique au cours de ce travail est *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale. Les travaux effectués sur l'extrait acétonique de cette espèce sont décrits ci-après.

IV.3. Purification de l'extrait de *F. caperata* (L.) Hale

Dans un premier temps, la reprise de l'extrait brut sec (3,44 g) par l'acétone conduit à la formation d'un précipité (FcP). Après centrifugation, ce dernier est obtenu avec une masse de 2,38 g ce qui représente près de 70 % des composés extraits. Celui-ci est repris par du dichlorométhane pour obtenir un surnageant correspondant au composé Fc1, et un précipité formé par le composé Fc2. Le fractionnement est ensuite effectué sur le résidu obtenu après évaporation du surnageant de l'extrait. Les techniques utilisées sont la Chromatographie Liquide Moyenne Pression (CLMP) en phases inverse et normale, ainsi que la chromatographie d'exclusion stérique sur gel Sephadex LH-20 (Figure 111).

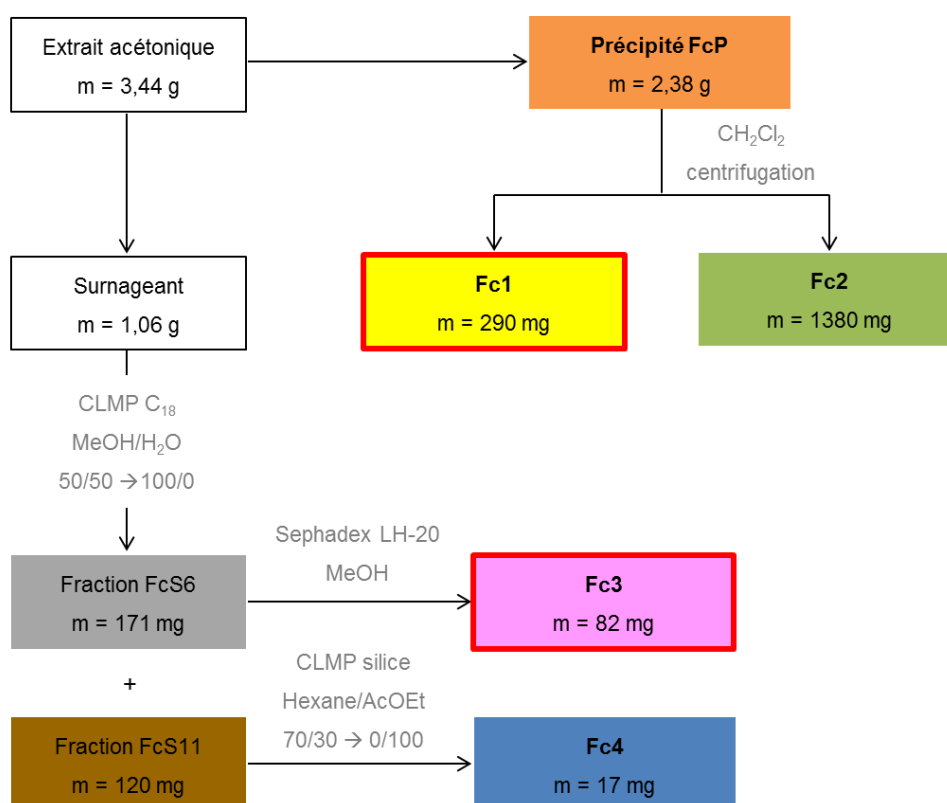


Figure 111 : Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus pour l'extrait de *F. caperata*. Les composés actifs par bioautographie sont encadrés en rouge.

La purification du surnageant par CLMP en phase inverse conduit à l'obtention de 14 fractions testées par bioautographie ; l'activité d'un composé sur *S. aureus* est mise en évidence pour la fraction FcS6 dont la purification sur gel de Sephadex LH-20 dans le méthanol permet de récupérer le composé

actif (Fc3). Une autre fraction issue de la CLMP, la fraction FcS11, contient un composé majoritaire (Fc4) qui est isolé après purification par CLMP en phase normale.

IV.3.1. Métabolites isolés

Au total, quatre métabolites ont été isolés à partir de l'extrait acétonique de *Flavoparmelia caperata* :

- L'acide (+)-usnique (Fc1)
- L'acide protocétrarique (Fc2)
- L'acide capératique (Fc3)
- Le peroxyde d'ergostérol (Fc4)

L'identification structurale des composés a été effectuée par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ^1H), et chaque fois que nécessaire, par RMN du carbone (RMN ^{13}C) ainsi que par des expérimentations RMN bidimensionnelles telles que COSY, HMQC et HMBC. Des analyses par Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR) ont également été réalisées sur chacun des composés. L'identification structurale des différents métabolites isolés est décrite ci-après.

IV.3.1.1. L'acide (+)-usnique (Fc1)

Lors de la purification, 290 mg de ce composé ont été récupérés. Le spectre de masse haute résolution met en évidence un ion moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 343,0818 correspondant à la formule brute $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$.

Etant donné que le laboratoire dispose d'un témoin d'acide (+)-usnique commercial, ce composé a été précédemment identifié par CCM et CLHP-UVBD. Une analyse par RMN ^1H a été réalisée afin de confirmer la structure du composé. Sur le spectre, les signaux caractéristiques de trois fonctions hydroxyle à 18,84 ; 13,31 et 11,03 ppm sont observés. Ils sont accompagnés d'un singulet à 5,98 ppm intégrant pour un proton, ainsi que de quatre singulets (2,68 ; 2,67 ; 2,11 et 1,76 ppm) qui intègrent chacun pour trois protons et signalent la présence de groupements méthyle.

Ces déplacements chimiques sont comparables à ceux décrits dans la littérature pour l'acide usnique, fréquemment retrouvé dans les lichens (Ivanova *et al.*, 2010). Son pouvoir rotatoire a également été déterminé ($[\alpha]^{24}_{\text{D}} = + 520$). Le composé Fc1 est donc l'**acide (+)-usnique**.

IV.3.1.2. L'acide protocétrarique (Fc2)

Lors de la purification, 1380 mg de ce composé ont été isolés. Le spectre de masse haute résolution en impact électronique met en évidence un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 373,0565 correspondant à la formule brute $C_{18}H_{14}O_9$.

Des analyses par RMN 1H et ^{13}C ont été réalisées afin de déterminer la structure du composé. Sur le spectre proton, les signaux caractéristiques d'une fonction hydroxyle à 11,94 ppm et d'un groupement aldéhydique à 10,59 ppm sont observés. Ils sont accompagnés notamment d'un singulet à 6,84 ppm intégrant pour un proton, ainsi que de deux singulets à 2,39 et 2,43 ppm qui intègrent chacun pour trois protons et signalent la présence de groupements méthyle. La RMN ^{13}C met en évidence la présence de trois fonctions carbonyle à 161,1 ; 170,0 et 191,6 ppm. Des déplacements correspondant à douze carbones quaternaires, dont un portant un proton, sont observés. Enfin, deux carbones à 14,3 et 21,3 ppm confirment la présence de deux groupements méthyle. Des expérimentations en RMN bidimensionnelle, notamment HMQC et HMBC ont permis de conforter la structure du composé.

Les déplacements chimiques observés en RMN 1H et ^{13}C sont similaires à ceux reportés dans la littérature pour l'**acide protocétrarique**, métabolite déjà décrit chez *Flavoparmelia caperata* ou encore *Ramalina farinacea* (Sala et Sargent, 1981) (Figure 112).

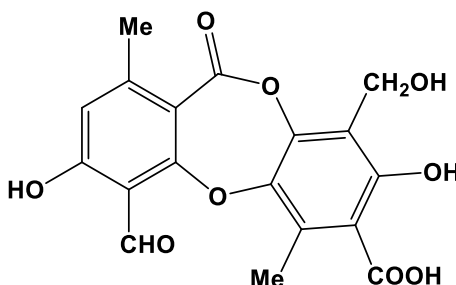


Figure 112 : Structure de l'acide protocétrarique isolé de *F. caperata*.

IV.3.1.3. L'acide capératique (Fc3)

Environ 80 mg de ce composé ont été isolés au cours de la purification, ce qui représente près de 2,5 % de la masse sèche de l'extrait. Le spectre de masse haute résolution met en évidence un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 403,2692 correspondant à la formule brute $C_{21}H_{40}O_7$.

Etant donné que le laboratoire dispose d'un témoin d'acide capératique, isolé de *Plastimatia glauca*, ce composé a été précédemment identifié par analyse CCM. Cependant, des analyses RMN 1H et ^{13}C ont été effectuées afin de confirmer son identification.

L'analyse RMN ^1H indique la présence d'un groupement méthyle terminal d'une chaîne aliphatique (3,64 ppm), de deux doublets ($J = 16$ Hz) à 3,09 et 2,72 ppm intégrant chacun pour un proton, d'un doublet dédoublé à 2,66 ppm intégrant pour un proton, de deux multiplets à 1,80 et 1,47 ppm intégrant chacun pour un proton, et enfin, la présence de 13 méthylènes entre 1,32 et 1,28 ppm. L'analyse RMN ^{13}C confirme la présence d'un groupement méthyle terminal d'une chaîne aliphatique (14,1 ppm), et met en évidence un groupement méthoxyle (54,8 ppm) ainsi que trois fonctions carbonyle à 172,4 ; 176,3 et 176,5 ppm. Enfin, 13 carbones dont les déplacements chimiques sont compris entre 23,8 et 33,1 ppm confirment la présence des méthylènes de la chaîne aliphatique. Une expérimentation HMBC a également été effectuée et permet l'attribution, sans ambiguïté, des trois carbonyles sur la structure (Figure 113).

Les déplacements chimiques observés en RMN ^1H et ^{13}C sont semblables à ceux reportés dans la littérature pour l'**acide capératique**, métabolite déjà décrit chez *Flavoparmelia caperata* (Huneck et Yoshimura, 1996).

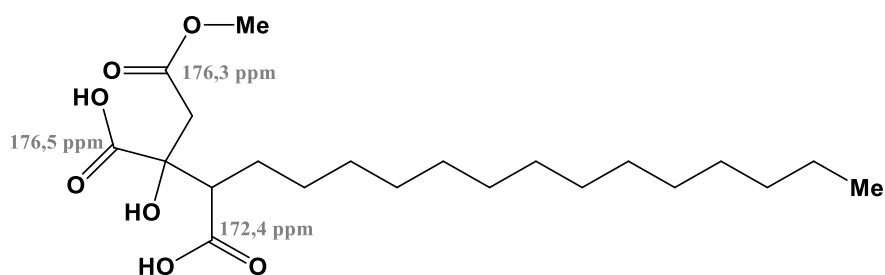


Figure 113 : Structure de l'acide capératique isolé de *F. caperata*.

IV.3.1.4. Le peroxyde d'ergostérol (Fc4)

Au cours de la purification, 17 mg de ce composé ont été isolés, ce qui correspond à près de 0,5 % de la masse sèche de l'extrait. Le spectre de masse haute résolution en impact électronique met en évidence un ion moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 429,3361 correspondant à la formule brute $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$.

Des analyses par RMN ^1H et ^{13}C ainsi que des expérimentations par RMN bidimensionnelle ont été réalisées afin de déterminer la structure du composé. Les déplacements chimiques observés en RMN ^1H mettent en évidence la présence de 6 groupements méthyle à 0,81 ; 0,82 ; 0,83 ; 0,89 ; 0,91 et 1,00 ppm.

L'analyse par RMN ^{13}C confirme la présence de 6 groupements méthyle à 12,9 ; 13,0 ; 17,6 ; 19,6 ; 19,9 et 20,9 ppm, et met en évidence la présence de 4 carbones hybridés sp^2 à 130,7 ; 132,3 ; 135,2 et 135,4 ppm.

Les déplacements chimiques obtenus pour ce composé sont comparables à ceux reportés dans la littérature pour le **peroxyde d'ergostérol** (Zhao *et al.*, 2014), métabolite déjà décrit chez les lichens (Figure 114).

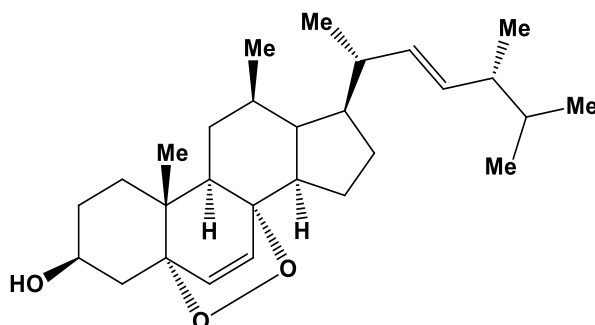


Figure 114 : Structure du peroxyde d'ergostérol isolé de *F. caperata*.

IV.3.2. Discussion sur les composés isolés de *F. caperata*

L'étude phytochimique menée sur *F. caperata* a permis d'isoler et d'identifier quatre composés de familles différentes, dont un est ici décrit pour la première fois dans l'espèce. Les acides (+)-usnique et protocétrarique sont les constituants majoritaires du précipité, qui représente environ 70 % de la masse sèche de l'extrait, et sont systématiquement retrouvés chez cette espèce (Culberson, 1969 ; Brandänge *et al.*, 1975 ; Ranković et Mišić, 2008). L'acide protocétrarique a récemment été mis en évidence pour la première fois dans le lichen *Usnea albobunctata*, dont il est un composé majoritaire de l'extrait acétate d'éthyle (Nishanth *et al.*, 2014).

L'acide capératique a également été identifié dans ce lichen et environ 80 mg ont été isolés, ce qui correspond à près de 2,5 % de la masse de l'extrait traité. Ce composé a précédemment été détecté chez *F. caperata* (Culberson, 1969) et il est aussi présent chez *Plastimatia glauca* (Culberson, 1970), *Plastimatia erosa* (Obermayer et Randlane, 2012), *Parmelia simulans* (Esslinger, 1972), et plusieurs espèces du genre *Usnea* (Carlin, 1986 ; Truong *et al.*, 2013).

Le peroxyde d'ergostérol a été isolé en faible quantité ; 17 mg ont été récupérés, soit environ 0,5 % de la masse sèche de l'extrait acétonique. Contrairement à l'ergostérol et au β -sitostérol 3 β -D-glucopyranoside, déjà décrits chez *F. caperata* (Sharma *et al.*, 2013), il semblerait que le peroxyde d'ergostérol soit identifié ici pour la première fois chez ce lichen. La présence de ce composé est également reportée dans d'autres espèces lichéniques telles que *Pseudevernia furfuracea* (Wojciechowski *et al.*, 1973) et *Ochrolechia parella* (Milot *et al.*, 2007), ainsi que dans certains champignons (Kim *et al.*, 1999 ; Yaoita *et al.*, 2001 ; Prompi boon *et al.*, 2008). Concernant son origine, deux hypothèses sont posées : il est possible que le peroxyde d'ergostérol ne soit pas un stérol naturel

mais un artefact formé à partir de l'ergostérol lors de la purification, ou bien qu'il soit un intermédiaire naturel impliqué dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Wojciechowski *et al.*, 1973).

La Figure 115 ci-dessous présente le chromatogramme de l'extrait acétonique de *Flavoparmelia caperata* sur lequel les composés isolés majoritaires ont été repérés.

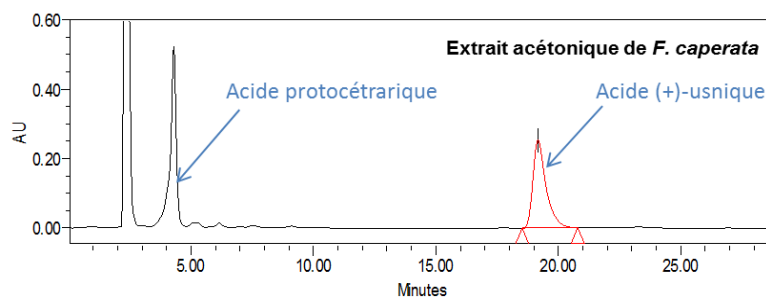


Figure 115 : Repérage, sur le chromatogramme de l'extrait acétonique (à 230 nm), des composés majoritaires isolés à partir de *F. caperata* (CLHP C18 ; MeOH/H₂O/H₃PO₄ 80/20/0,9 (v/v/v) ; 1 mL/min).

V. CONCLUSION GENERALE SUR LE FRACTIONNEMENT BIOGUIDE DES EXTRAITS

L'étude phytochimique de trois espèces de lichen, réalisée au cours de ce travail, a permis d'isoler 16 composés de structures variées (outre le composé non identifié Ci7, supposé être l'acide rhodocladonique), appartenant principalement aux familles des dibenzofuranes, depsides et depsidones (Figure 116). Cette diversité de métabolites secondaires témoigne en particulier de la pluralité des voies de biogenèse mises en jeu au sein des lichens.

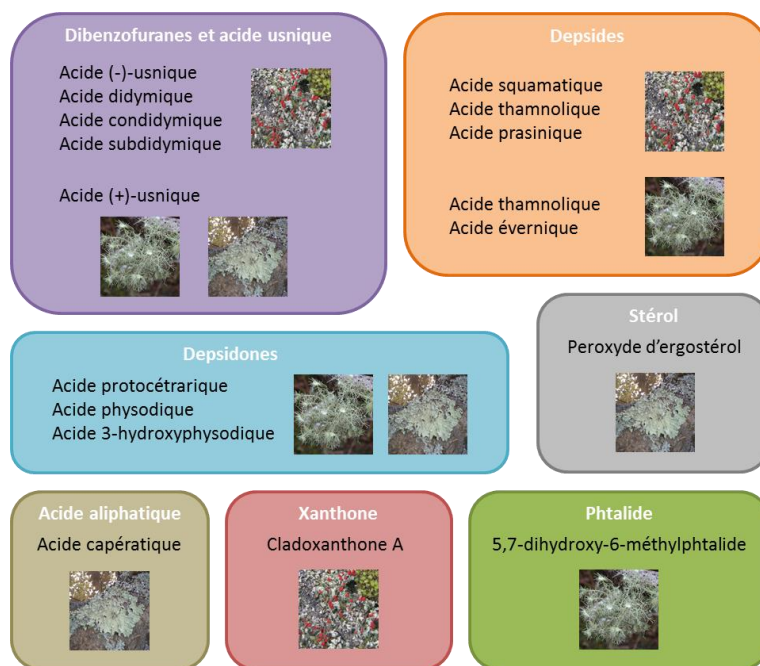


Figure 116 : Bilan des composés isolés à partir des trois espèces de lichen.

L'acide usnique est le composé commun aux trois espèces avec l'isomère le plus commun, l'acide (+)-usnique, présent chez *Usnea florida* et *Flavoparmelia caperata*, et l'acide (-)-usnique, isomère le plus rare, identifié chez *Cladonia incrassata*. Parmi les depsides isolés, l'acide thamnolique est un composé retrouvé à la fois dans *C. incrassata* et dans *U. florida*, chez lequel il est majoritaire. L'acide usnique est le métabolite majeur de l'extrait avec l'acide thamnolique pour *U. florida*, et l'acide protocétrarique pour *F. caperata*, tandis qu'il est moins présent chez *C. incrassata*. Ainsi, l'accès aux métabolites minoritaires a été moins aisé dans le cas de ces deux espèces par rapport au *Cladonia*.

Aussi, les dibenzofuranes ont été isolés exclusivement du *Cladonia*, qui contient peu d'acide usnique. En effet, il semblerait que certaines espèces de ce genre, qui synthétisent peu ou pas d'acide usnique, produisent en compensation des dibenzofuranes. C'est le cas par exemple de *C. didyma* (Chester *et al.*, 1986), *C. rangiferina* (Yoshikawa *et al.*, 2008), *C. miniata* (Morales Mendez *et al.*, 1985) ou encore *C. squamulosa* (Chester et Elix, 1981). Lors du criblage des espèces récoltées, nous avons

d'ailleurs observé par CCM la présence de dibenzofuranes de la famille de l'acide didymique dans l'extrait acétonique d'un *Cladonia* à apothécies rouges ne contenant pas d'acide usnique, *C. macilenta*.

La voie de biogenèse des dibenzofuranes se trouverait ainsi préférentiellement activée par rapport à celle conduisant à l'acide usnique. Au cours de cette étude, trois dibenzofuranes de structures très semblables ont été isolés de *Cladonia incrassata* : les acides didymique, condidymique et subdidymique. Ils se différencient uniquement par la longueur de leurs chaînes latérales, ce qui induit des migrations similaires par chromatographie sur couche mince en phase normale et des spectres UV identiques. Seule une analyse par CLHP en phase inverse permet de les séparer avec des temps de rétention bien distincts.

Quatre depsides ont également été identifiés dans les lichens étudiés. L'acide squamatique est un composé majeur de *C. incrassata* qui confère une fluorescence blanche à 254 nm, ce qui peut être une indication utile pour suspecter sa présence avant même l'extraction lorsqu'il est majoritaire. L'acide thamnolique a également été détecté en plus faible quantité et constitue le deuxième composé commun à *C. incrassata* et *U. florida*. Aussi, un depside plus rarement retrouvé chez les lichens et possédant de longues chaînes aliphatiques, l'acide prasinique, a été identifié pour la première fois dans une espèce du genre *Cladonia*. Enfin, un depside très minoritaire a été isolé pour la première fois d'*U. florida* : l'acide évernique.

Concernant les depsidones, cette étude a permis d'isoler l'acide protocétrarique de *F. caperata* et également de mettre en évidence la présence de deux métabolites minoritaires à longues chaînes latérales jamais décrits dans *U. florida* : les acides physodique et 3-hydroxyphysodique.

Parmi les composés isolés, six d'entre eux (trois dibenzofuranes, une depside et deux depsidones) sont substitués par des chaînes aliphatiques comptant de trois à sept carbones. La présence de tels composés n'est pas rare puisqu'ils représentent environ 20 % chez les dibenzofuranes et depsidones, et plus de 50 % chez les depsides décrits (Figure 117).

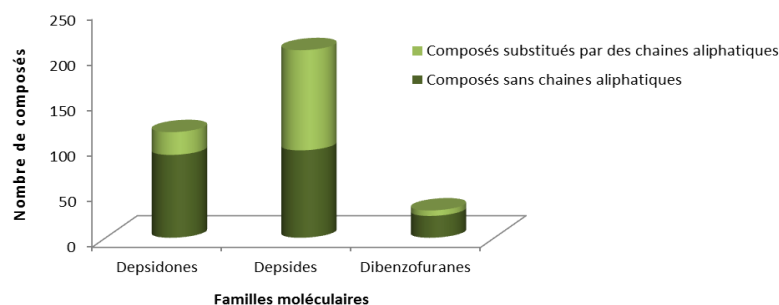


Figure 117 : Proportion des composés portant des chaînes aliphatiques parmi les depsidones, depsides et dibenzofuranes (d'après Huneck et Yoshimura, 1996).

La présence de composés polyphénoliques porteurs de chaînes latérales suggère l'importance de ce type de substitution afin de préserver l'intégrité du thalle lichénique. Une relation structure-activité peut ainsi être envisagée : de telles chaînes apolaires permettraient une meilleure pénétration des composés dans les membranes des micro-organismes pathogènes et amélioreraient ainsi l'activité antimicrobienne des métabolites au sein des lichens. En effet, une étude réalisée par modélisation moléculaire au sein du laboratoire a montré que la présence de chaînes lipophiles favorise l'ancrage des molécules dans les membranes (Fabre *et al.*, article en préparation).

L'isolement du 5,7-dihydroxy-6-méthylphtalide (phtalide), peu décrit chez les lichens, à partir de l'extrait d'*U. florida*, de l'acide capératique (acide aliphatique) ainsi que du peroxyde d'ergostérol (stérol) à partir de l'extrait de *F. caperata*, vient enrichir la diversité des métabolites rencontrés au cours de ce travail.

Enfin, un composé nouveau a été isolé de *C. incrassata* : une chloroxanthone nommée cladoxanthone A. La présence de xanthones chlorées dans les lichens est bien connue. En effet, des métabolites chlorés sont retrouvés chez les xanthones, les depsidones, les depsides ou encore les anthraquinones (Huneck et Yoshimura, 1996). La répartition des composés chlorés en fonction des différentes classes de molécules est présentée sur le graphique à secteurs ci-dessous (Figure 118).

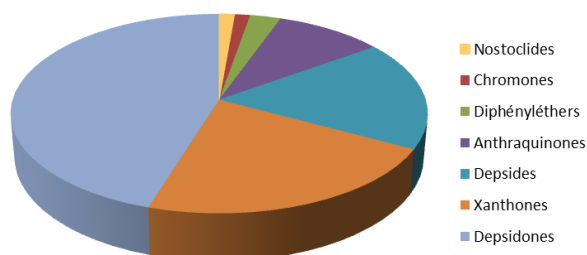


Figure 118 : Répartition des composés chlorés parmi les grandes classes de métabolites lichéniques (d'après Huneck et Yoshimura, 1996).

Il est à noter que très peu de dibenzofuranes lichéniques chlorés sont reportés. Néanmoins, on peut citer quelques composés dérivés des acides didymique et condidymique : les acides 8-chloroxodidymique, 8-chlorodioxocondidymique et 8-chlorodioxodidymique, isolés de lichens appartenant au genre *Letrouitia* (Johansson *et al.*, 2005) (Figure 119).

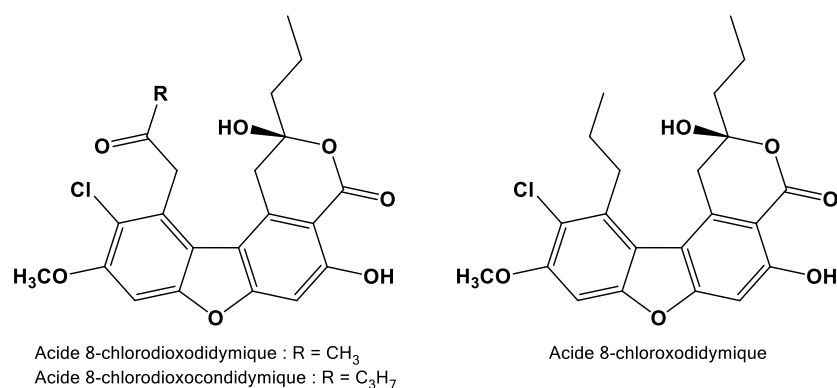


Figure 119 : Exemples de dibenzofuranes lichéniques chlorés.

Les xanthones sont, après les depsidones, les composés le plus souvent chlorés et l'isolement d'une chloroxanthone n'est donc pas surprenant. Cependant, la position du groupement méthyle sur sa structure en fait une xanthone singulière qui la différencie de celles classiquement décrites dans la littérature.

Le fractionnement bioguidé mis en œuvre au cours de ce travail a permis d'isoler, à partir des extraits acétoniques des trois lichens, un certain nombre de métabolites d'intérêt. Dans un premier temps, leur activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* a été évaluée par bioautographie ; dans un second temps, leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) vis-à-vis de cette même souche ont été déterminées (pour les composés obtenus en quantité suffisante, > 10 mg).

VI. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES COMPOSES ISOLÉS

VI.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par bioautographie

Etant donné qu'elle nécessite peu de produit, cette technique a pu être mise en œuvre sur tous les composés isolés, quelles que soient les quantités obtenues, afin d'en évaluer l'activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus*.

VI.1.1. Métabolites de *C. incrassata* Flörke

Tous les composés isolés du lichen *C. incrassata* ont été déposés sur plaque CCM (entre 5 et 20 µg). Après révélation par le MTT, les résultats obtenus par bioautographie mettent en évidence l'activité des acides subdidymique (Ci1), didymique (Ci2), condidymique (Ci3), (-)-usnique (Ci4), prasinique (Ci5) et de la cladoxanthone A (Ci6), tandis qu'aucune activité n'a été démontrée pour l'acide squamatique (Figure 120).

L'acide (-)-usnique (Ci4) possède une activité sur *S. aureus*, ce qui est en accord avec les données bibliographiques démontrant l'effet de ce composé sur une autre souche de cette bactérie par la méthode des disques (Yilmaz *et al.*, 2004).

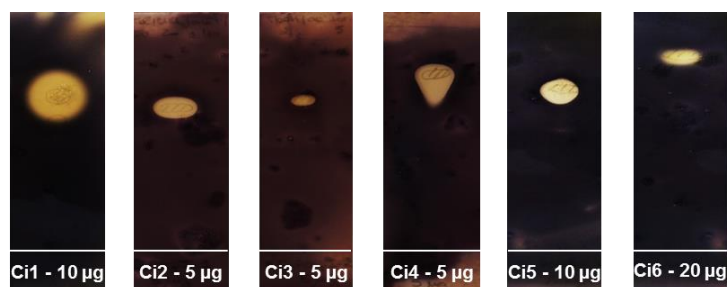


Figure 120 : Technique de bioautographie appliquée aux composés isolés de l'extract acétonique de *C. incrassata*.

Ci1 : acide subdidymique, Ci2 : acide didymique, Ci3 : acide condidymique, Ci4 : acide (-)-usnique, Ci5 : acide prasinique, Ci6 : cladoxanthone A. La coloration violette indique la présence des micro-organismes vivants, tandis que les halos d'inhibition blanchâtres mettent en évidence l'activité des composés vis-à-vis de *S. aureus*.

Eluant : toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5 (v/v/v).

Pour une quantité déposée équivalente (5 µg), l'acide didymique (Ci2) semble avoir une activité plus importante que l'acide condidymique (Ci3). Cette observation est cohérente avec les résultats d'une étude antérieure au cours de laquelle un test par la méthode des disques a été effectué sur les acides didymique et condidymique isolés de *Cladonia rangiferina* (Yoshikawa *et al.*, 2008). La différence structurale entre les acides didymique et condidymique est la longueur d'une des deux chaînes latérales. Ces résultats laissent supposer une relation structure-activité concernant l'influence de la longueur de ces chaînes sur l'inhibition de la croissance bactérienne.

L'activité antibactérienne des acides subdidymique (Ci1) et prasinique (Ci5) est également mise en évidence (pour 10 µg déposés). A notre connaissance, l'activité antibactérienne de ce dernier n'a jamais été décrite dans la littérature. Une activité antitumorale modérée sur différentes lignées de cellules cancéreuses est reportée dans la littérature pour un dérivé déméthoxylé de l'acide prasinique (Chakor *et al.*, 2012). Pour la cladoxanthone A (Ci6), un effet antibactérien sur *S. aureus* est observé pour une quantité déposée de 20 µg, ce qui est en accord avec la littérature puisque de nombreuses propriétés biologiques, dont des activités antimicrobiennes, y sont reportées pour les xanthones (Masters et Bräse, 2012). Enfin, ces résultats mettent en évidence que la forte activité antibactérienne de l'extrait de *C. incrassata* sur *S. aureus*, démontrée lors du challenge test, peut être attribuée aux effets combinés des composés décrits.

VI.1.2. Métabolites d'*Usnea florida* (L.) Weber ex F.H. Wigg.

L'activité antibactérienne des 7 composés isolés de ce lichen a été évaluée comme précédemment après dépôt sur plaque CCM (entre 5 et 20 µg). Parmi ces 7 composés, les acides (+)-usnique (Uf1), physodique (Uf5) et 3-hydroxyphysodique (Uf6) possèdent une activité sur la souche bactérienne pour des quantités déposées de 5 et 10 µg (Figure 121).

Ces observations sont en accord avec les études reportées dans la littérature qui démontrent une activité de ces trois composés sur *S. aureus*. Si l'activité de l'acide (+)-usnique y est largement décrite (Ingólfssdóttir, 2002), peu de travaux sont disponibles concernant les deux autres composés. Néanmoins, des études ont mis en évidence l'activité des acides physodique et 3-hydroxyphysodique par la méthode des disques, sur la même souche de *S. aureus* que celle utilisée au cours de ce travail (Yilmaz *et al.*, 2005 ; Türk *et al.*, 2006). Plus récemment, des tests en microplaques effectués pour l'acide physodique sur une autre souche de *S. aureus* (ATCC 25923) ont permis de déterminer une concentration minimale inhibitrice de 31,2 µg/mL, comparable à celle de l'antibiotique utilisé comme témoin positif, la streptomycine (Kosanić *et al.*, 2013).

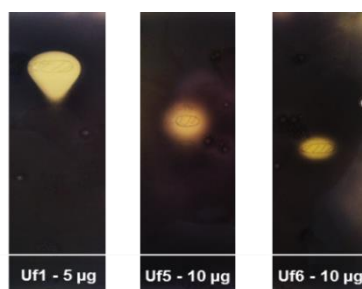


Figure 121 : Technique de bioautographie appliquée aux composés isolés de l'extrait acétonique d'*U. florida*. Uf1 : acide (+)-usnique, Uf5 : acide physodique, Uf6 : acide 3-hydroxyphysodique. La coloration violette indique la présence des micro-organismes vivants, tandis que les halos d'inhibition blanchâtres mettent en évidence l'activité des composés vis-à-vis de *S. aureus*. Eluant : toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5 (v/v/v).

Dans le cas de l'acide 3-hydroxyphysodique, la présence de la fonction hydroxyle semble avoir une influence avec une activité plus faible sur *S. aureus* (zone d'inhibition moins étendue) par rapport à l'acide physodique.

Pour une quantité déposée de 20 µg, l'acide évernique (Uf4) a montré une très faible activité sur *S. aureus*. Sur cette même souche, une concentration minimale inhibitrice de 0,5 mg/mL (soit 16 fois plus élevée que celle de l'acide physodique) est reportée dans la littérature pour ce composé (Kosanić *et al.*, 2013).

Enfin, aucune activité n'a été détectée pour le 5,7-dihydroxy-6-méthylphthalide et l'acide thamnolique.

VI.1.3. Métabolites de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale

Les 4 composés isolés du lichen *F. caperata* ont été déposés sur plaque CCM afin de déterminer leur activité antibactérienne. Pour des quantités déposées comprises entre 5 et 20 µg, l'acide protocétrarique et le peroxyde d'ergostérol n'ont montré aucune activité sur *S. aureus*, alors que l'acide (+)-usnique (Fc1) ainsi que l'acide capératique (Fc3) ont un effet notable sur cette souche bactérienne (Figure 122).

Concernant l'acide capératique (Fc3), sa révélation par l'ANS n'est pas adaptée, et la coloration rose n'est pas toujours observée pour ce composé (Figure 122A). D'autres révélateurs, l'eau distillée (Figure 122B) et le bleu de bromothymol (Figure 122C), ont donc été utilisés et permettent de le visualiser en blanc.

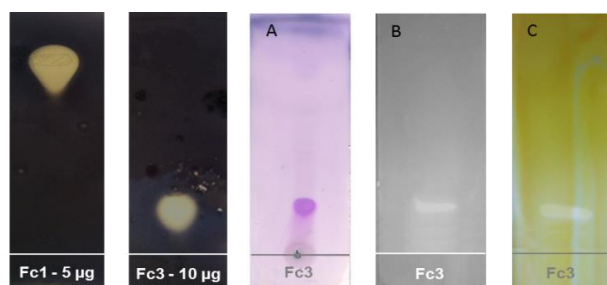


Figure 122 : Technique de bioautographie appliquée aux composés isolés de l'extrait acétonique de *F. caperata* (à gauche). Fc1 : acide (+)-usnique, Fc3 : acide capératique. A : révélation par l'ANS ; B : révélation par l'eau distillée ;

C : révélation par le bleu de bromothymol.

Eluant : toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5 (v/v/v).

L'acide capératique est décrit pour avoir une activité antiherbivore vis-à-vis d'une espèce de limace (Lawrey, 1983) mais, à notre connaissance, aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant une potentielle activité antibactérienne. Ce résultat préliminaire obtenu par bioautographie sur *S. aureus* est donc particulièrement intéressant pour ce composé.

Pour les composés isolés des trois espèces de lichen ayant démontré une activité antibactérienne par bioautographie, des tests de dilution en microplaques ont ensuite été effectués afin de déterminer leurs concentrations minimales inhibitrices. En effet, la bioautographie est une méthode semi-quantitative et des tests en milieu liquide sont nécessaires pour préciser l'activité antibactérienne des composés.

VI.2. Détermination des pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne et des concentrations minimales inhibitrices

Afin de déterminer leurs pourcentages d'inhibition de croissance et leurs concentrations minimales inhibitrices sur la souche de *S. aureus*, un test de dilution en microplaques a été mis en œuvre pour les composés actifs par bioautographie et obtenus en quantité suffisante. Il s'agit des acides (-)-usnique, (+)-usnique, didymique, condidymique, capératique (Figure 123). Etant donné que peu d'acide (-)-usnique a été isolé à partir de *C. incrassata*, celui utilisé pour les essais provient d'un autre lichen étudié au laboratoire, *Leprocaulon microscopicum*.

Bien qu'il n'ait pas démontré d'activité par bioautographie, l'acide protocétrarique a également fait l'objet de ce test. En effet, des travaux reportés dans la littérature mettent en évidence une bonne activité de ce composé sur *S. aureus* (Manojlović *et al.*, 2012 ; Ranković et Mišić, 2008) (Figure 123).

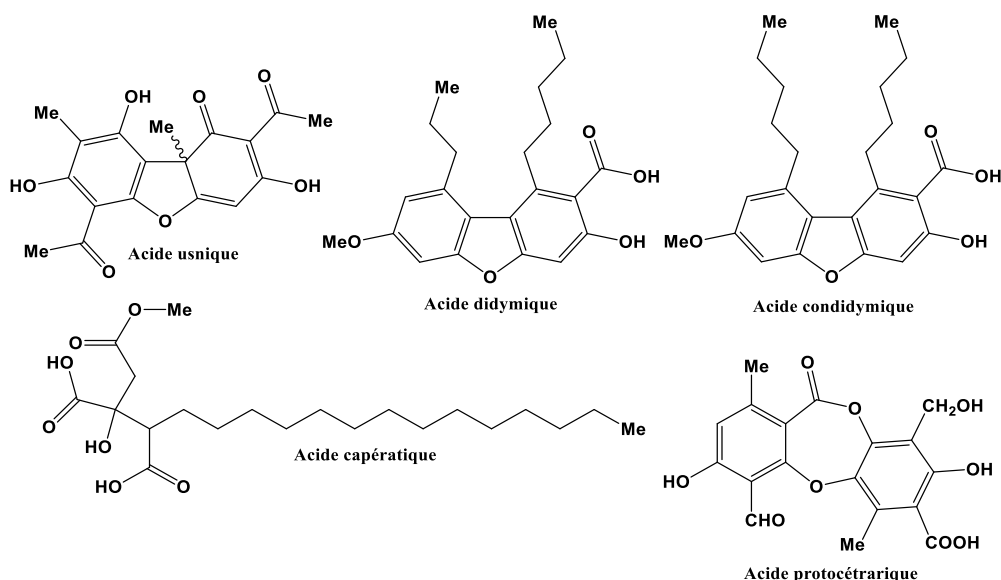


Figure 123 : Métabolites isolés en quantité suffisante pour évaluer leurs CMI.

Afin de déterminer leurs concentrations minimales inhibitrices, les 6 composés ont été testés à des concentrations comprises entre 1 et 12,5 µg/mL. Plusieurs tests en microplaques préliminaires à ceux présentés ci-après ont dû être mis en œuvre pour les acides didymique, condidymique et

capératique pour lesquels aucune donnée de CMI sur *S. aureus* n'est disponible dans la littérature. Les pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne ont été calculés selon la même formule que pour les extraits bruts (Figure 124 et Figure 125).

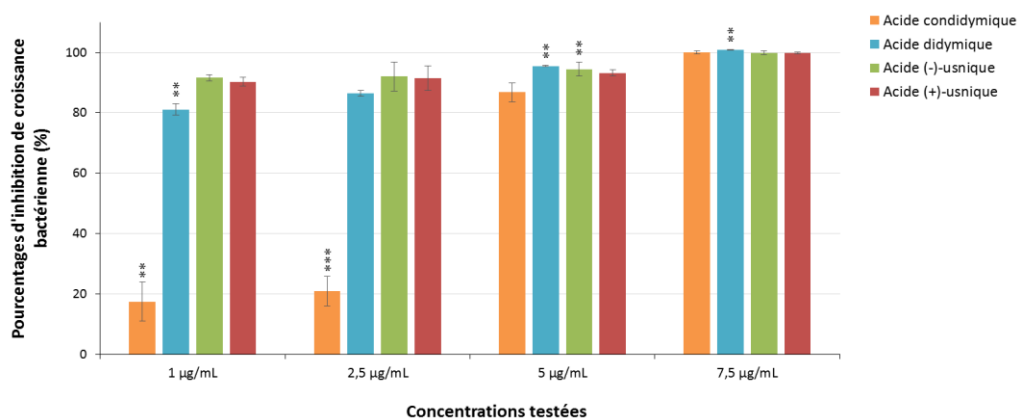


Figure 124 : Pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne des acides condidymique, didymique, (-)-usnique et (+)-usnique testés à 1 ; 2,5 ; 5 et 7,5 µg/mL sur *Staphylococcus aureus*. Les résultats ont été analysés par un test de Student de type t avec *p < 0,05 ; **p < 0,01 et ***p < 0,001 par rapport au témoin acide (+)-usnique.

Pour les 4 composés testés, la concentration minimale inhibitrice sur cette souche de *S. aureus* est atteinte pour une concentration de 7,5 µg/mL.

Les pourcentages d'inhibition obtenus pour les acides (-)-usnique et (+)-usnique sont similaires (différences non significatives) pour toutes les concentrations testées. De même, les pourcentages d'inhibition pour l'acide didymique sont proches de ceux obtenus pour les acides (+)-usnique et (-)-usnique. Pour ces trois composés, la concentration minimale inhibant 50 % de la croissance bactérienne, notée CMI₅₀, est inférieure à 1 µg/mL.

Concernant l'acide condidymique, le pourcentage d'inhibition de croissance est multiplié par 4 entre les concentrations 2,5 et 5 µg/mL. Aussi, pour les concentrations de 1 et 2,5 µg/mL, les pourcentages d'inhibition de ce composé sont environ 4 à 5 fois inférieurs à ceux des acides didymique et usnique. Bien que leurs CMI soient similaires, la CMI₅₀ de l'acide condidymique est comprise entre 2,5 et 5 µg/mL, et donc supérieure à celle de l'acide didymique. Cette différence de CMI₅₀ entre ces deux composés met en évidence une relation structure-activité notable. En effet, la seule variation structurale entre ces deux composés se situe au niveau d'une des deux chaînes latérales portées par les cycles benzéniques (deux carbones supplémentaires pour l'acide condidymique). Cette différence de structure semble donc influencer significativement leurs activités en induisant des cinétiques et/ou des modes d'action distincts pour les deux molécules.

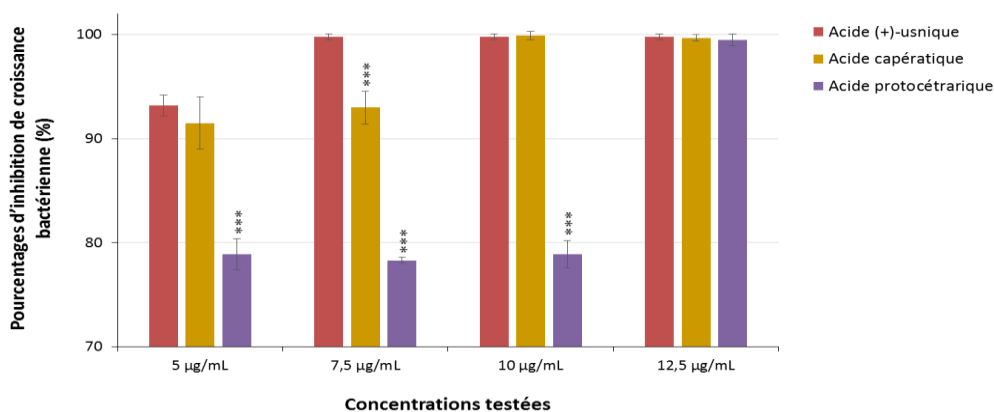


Figure 125 : Pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne des acides protocétratique, capératique et (+)-usnique testés à 5 ; 7,5 ; 10 et 12,5 µg/mL sur *Staphylococcus aureus*. Les résultats ont été analysés par un test de Student de type t avec *p < 0,05 ; **p < 0,01 et ***p < 0,001 par rapport au témoin acide (+)-usnique.

Dans le cas des acides capératique et protocétratique, les CMI obtenues sont respectivement de 10 et 12,5 µg/mL, et leurs CMI₅₀ sont inférieures à 5 µg/mL. Aux concentrations de 5 ; 10 et 12,5 µg/mL, l'acide capératique présente une activité similaire à celle de l'acide (+)-usnique (CMI atteintes pour les deux composés), tandis que les pourcentages d'inhibition de l'acide protocétratique sont stables et significativement inférieurs à ceux de l'acide (+)-usnique entre 5 et 10 µg/mL.

Enfin, contrairement aux résultats obtenus par bioautographie, une activité est ici mise en évidence pour l'acide protocétratique ; en effet, la technique de dilution en milieu liquide est une méthode plus sensible et plus précise.

Comme pour les extraits bruts, le Phénonip® et la ciprofloxacine ont été utilisés comme témoins positifs. Les CMI obtenues pour les témoins et les composés isolés sont récapitulées dans le Tableau 15 et sont exprimées en µg/mL ainsi qu'en µmol/L.

Tableau 15 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des composés isolés (exprimées en µg/mL et µmol/L).

Echantillon	CMI (µg/mL)	CMI (µmol/L)
Acide (-)-usnique	7,5	21,8
Acide (+)-usnique	7,5	21,8
Acide didymique	7,5	20,3
Acide condidymique	7,5	18,8
Acide capératique	10,0	24,8
Acide protocétratique	12,5	33,4
Phénonip®	> 300	-
Ciprofloxacine	1,0	3,0

Au cours de ce travail, une souche de *S. aureus* non résistante aux antibiotiques a été utilisée ; sur cette dernière, les acides didymique et condidymique montrent une activité similaire à celle des deux isomères de l'acide usnique, ainsi qu'une CMI plus de 40 fois inférieure à celle du Phénonip®. Aussi, les acides (+)-usnique, (-)-usnique, didymique et condidymique ont une CMI environ 7 fois supérieure à celle déterminée pour l'antibiotique de référence, la ciprofloxacine.

Des activités bactériostatiques similaires sont mises en évidence pour les deux énantiomères de l'acide usnique, ce qui est cohérent avec une autre étude au cours de laquelle des effets semblables ont été observés pour ces composés sur des souches de *S. aureus* méthicilline et mupirocine résistantes, conduisant à des CMI comprises entre 8 et 16 µg/mL (Lauterwein *et al.*, 1995). Sur d'autres souches multirésistantes de *S. aureus*, des CMI comprises entre 8 et 16 µg/mL ont également été déterminées dans d'autres travaux (Kokubun *et al.*, 2007), tandis qu'une CMI plus élevée, de 31 µg/mL, a été obtenue plus récemment sur une autre souche de *S. aureus* (Sultana et Afolayan, 2011).

Si l'activité de l'acide didymique sur *S. aureus* est reportée dans la littérature (Shibata *et al.*, 1949 ; Yoshikawa *et al.*, 2008), aucune information n'est disponible concernant les concentrations minimales inhibitrices des acides didymique et condidymique vis-à-vis d'une souche de *S. aureus*, et elles sont donc reportées ici pour la première fois.

Bien qu'elle soit 10 fois supérieure à celle de la ciprofloxacine, la CMI de l'acide capératique est proche de celle de l'acide usnique, et nettement moins élevée que celle du Phénonip®. A l'instar des acides didymique et condidymique, il n'y a, à notre connaissance, aucune donnée relative à la CMI de ce composé vis-à-vis de *S. aureus* dans la littérature.

L'acide protocétrarique est le composé dont la CMI est la plus élevée parmi les 6 métabolites testés. Cependant, il possède une activité bactériostatique beaucoup plus intéressante que le Phénonip®. Enfin, la CMI déterminée pour ce composé est cohérente avec celle de 15 µg/mL reportée dans les travaux de Manojlović *et al.* (2012) sur une autre souche de *S. aureus* (ATCC 25923).

VI.3. Conclusion sur l'activité antibactérienne des composés isolés

Tous les composés isolés à partir des trois extraits lichéniques ont fait l'objet d'un test par bioautographie quelles que soient les masses isolées. En effet, cette méthode nécessite une très faible quantité de produit et permet d'obtenir des résultats préliminaires sur une potentielle activité antibactérienne des composés.

Les composés actifs par bioautographie ont ensuite été soumis à des tests de dilution en milieu liquide (en microplaques). Cependant, cette technique nécessite une masse plus importante que la bioautographie. Elle a donc été appliquée uniquement aux métabolites isolés en quantité suffisante (>10 mg). Leurs pourcentages d'inhibition de croissance et leur concentration minimale inhibitrice ont pu ainsi être déterminés vis-à-vis de *S. aureus*, et viennent compléter les données de la littérature notamment pour les acides didymique, condidymique et capératique.

Aucune activité n'a été détectée par bioautographie pour l'acide protocétrarique, isolé de *Flavoparmelia caperata*, alors que son effet antibactérien est décrit dans la littérature. Au vu de cette constatation, ce composé a également été testé en microplaque et s'est révélé actif sur *S. aureus* avec une CMI de 12,5 µg/mL. En effet, si la bioautographie est une technique simple et rapide à mettre en œuvre, différents facteurs peuvent influencer la détection de l'activité antibactérienne. En particulier, la solubilité des composés testés joue un rôle déterminant dans leur diffusion dans le milieu de culture (Rios *et al.*, 1988). De ce fait, l'activité de certains composés, comme l'acide protocétrarique, peut être sous-estimée voire non détectée (selon la quantité déposée).

Les deux techniques utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne des composés isolés présentent chacune des avantages et des limites (répertoriés dans le Tableau 16), dont il convient de tenir compte.

Tableau 16 : Avantages et limites des techniques utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne des composés isolés.

Méthode	Avantages	Limites
Bioautographie	Rapide, facile à mettre en œuvre	Les résultats peuvent être biaisés par une difficulté ou une absence de migration des composés dans la gélose
	Nécessite peu de produit (<1mg)	
Test de dilution en milieu liquide (microplaques)	Détermination précise de la CMI	Technique plus contraignante à mettre en place
	Milieu homogène permettant de s'affranchir des problèmes de diffusion	Nécessite une quantité minimum de produit (>10mg)

Enfin, les résultats obtenus pour les acides didymique et condidymique par bioautographie et en milieu liquide donnent des pistes concernant une éventuelle relation entre la structure et l'activité antibactérienne de ces deux composés (Figure 126).

En effet, le test par bioautographie a révélé une zone d'inhibition de croissance plus étendue pour l'acide didymique par rapport à l'acide condidymique, ce qui laisse envisager deux hypothèses :

- Une migration moindre de l'acide condidymique dans la gélose par rapport à l'acide didymique, limitant ainsi la mise en contact du composé avec *S. aureus*

et/ou

- Une différence de mode et/ou de vitesse d'action sur *S. aureus* entre les deux composés.

De plus, les tests en microplaques ont mis en évidence une différence de CMI₅₀ notable entre les acides didymique et condidymique, bien que leurs CMI soient semblables. Ce constat vient étayer la seconde hypothèse et met en avant l'influence de la concentration testée sur les pourcentages d'inhibition et donc sur le mode et/ou la vitesse d'action des composés.

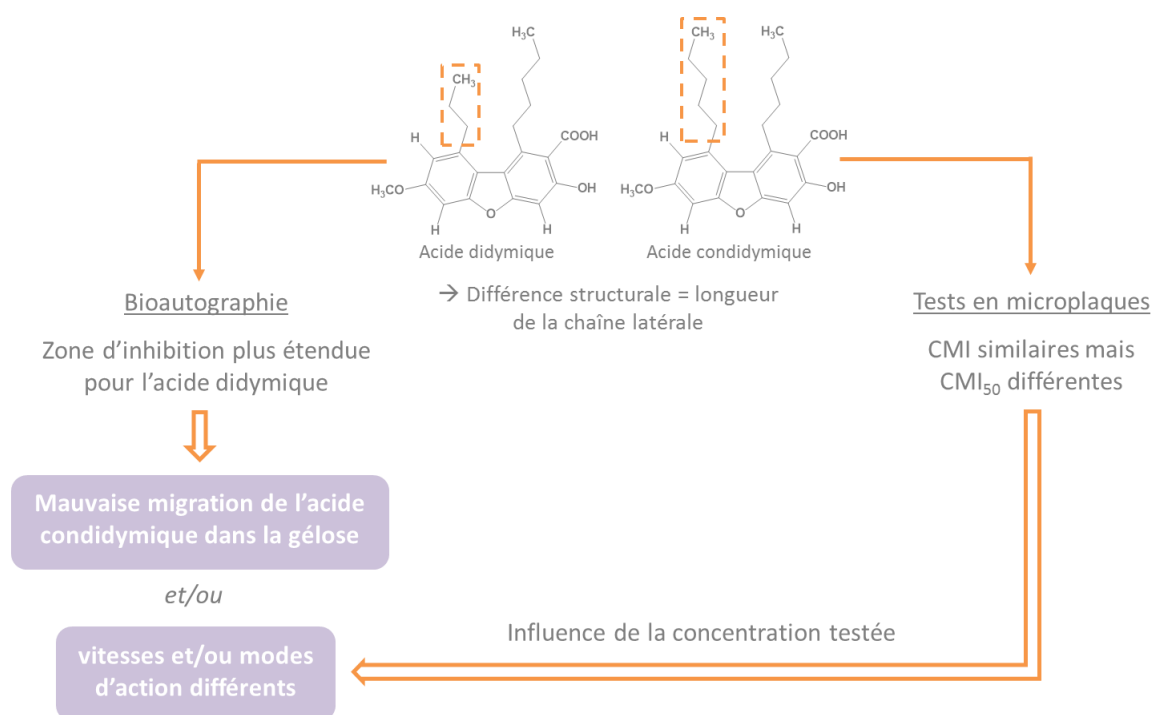


Figure 126 : Résultats obtenus pour les acides didymique et condidymique par bioautographie et tests en milieu liquide.

Hypothèses proposées pour expliquer les différences d'activité sur *S. aureus*.

VII. CONCLUSION GENERALE SUR L'ACTIVITE DES EXTRAITS ET DES METABOLITES ISOLES

Dans un premier temps, l'effet microbicide et/ou microbiostatique des extraits a été évalué par une méthode adaptée du challenge test. Contrairement au Phénonip®, les extraits et l'acide usnique n'ont montré aucune activité sur les bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) aux concentrations testées. En revanche, sur *S. aureus* (bactérie à Gram positif), *C. albicans* (levure) et *A. brasiliensis* (champignon), les extraits lichéniques possèdent une activité similaire ou supérieure à celles de l'acide usnique et du Phénonip®. De plus, l'effet bactéricide fort et rapide sur *S. aureus* de *C. incrassata* a laissé supposer la présence de composés bioactifs autres que l'acide usnique dans cet extrait. Des tests en microplaques, permettant d'évaluer l'effet bactériostatique sur *S. aureus*, ont également démontré que l'activité des extraits est supérieure à celle du Phénonip®, avec de meilleurs pourcentages d'inhibition de croissance. Cette méthode ainsi que celle adaptée du challenge test ont enfin mis en évidence des corrélations faibles à moyennes entre la quantité d'acide usnique dans les extraits et l'activité antimicrobienne. Cela laisse supposer la présence, dans chaque extrait, de composés bioactifs autres que l'acide usnique, et donc un effet synergique ou cumulé sur les souches microbiennes testées. Les différents résultats obtenus sont récapitulés dans la Figure 127.

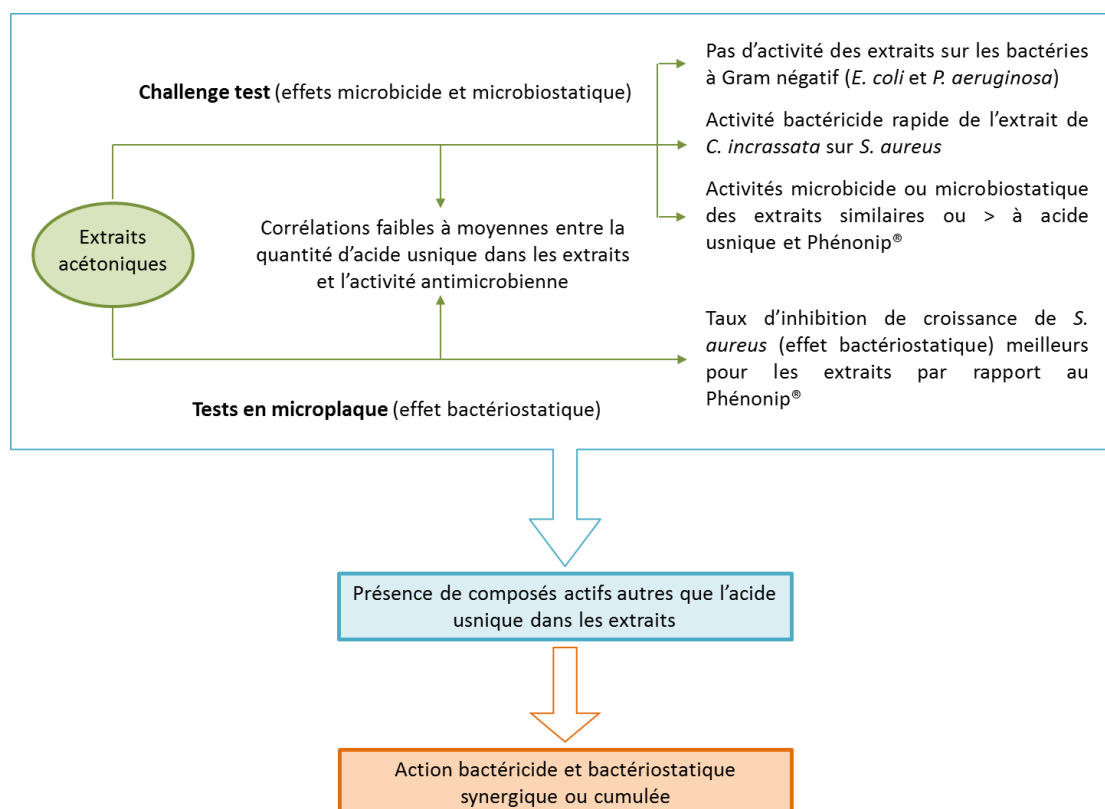


Figure 127 : Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits lichéniques par la méthode adaptée du challenge test et les tests en microplaques.

Dans un deuxième temps, des tests par bioautographie ont confirmé la présence, dans les trois extraits bruts, de composés dont l'acide usnique actifs sur *S. aureus*. Le fractionnement bioguidé des extraits a ensuite été mis en œuvre. Ainsi, 16 composés ont été isolés au cours de ce travail, dont une dizaine d'entre eux a montré une activité vis-à-vis de *S. aureus* par bioautographie : les acides (+)-usnique et (-)-usnique, trois dibenzofuranes (acides didymique, condidymique et subdidymique), un depside (acide prasinique), deux depsidones (acides physodique et 3-hydroxyphysodique), un acide aliphatique (acide capératique) et la xanthone nouvelle (cladoxanthone A). Parmi ceux-ci, 6 ont fait l'objet de tests de dilution en milieu liquide en microplaques sur la même souche bactérienne : tous les composés ont montré une activité bactériostatique supérieure au Phénonip® avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI), comprises entre 7,5 et 12,5 µg/mL, très inférieures au mélange de parabènes témoin.

Les CMI des acides didymique, condidymique et capératique, non reportées dans la littérature sur *S. aureus*, ont été déterminées pour la première fois. De plus, celles obtenues pour les acides didymique et condidymique sont encourageantes puisqu'elles sont similaires à celle de l'acide usnique et nettement inférieures à celle du Phénonip®, tous deux utilisés comme agents de conservation dans l'industrie cosmétique. Ces deux composés, isolés du lichen *C. incrassata*, seraient donc des candidats potentiels pour de telles applications.

Concernant l'extrait de ce lichen, le challenge test a mis en évidence que sa forte activité bactéricide au temps t0 sur *S. aureus* n'est pas liée à l'acide usnique mais certainement à la présence d'autres composés actifs, isolés ensuite par fractionnement bioguidé. Avec une CMI similaire à celle de l'acide usnique, les acides didymique et condidymique en particulier, pourraient être responsables de cette activité rapide. En effet, la présence de longues chaînes latérales sur leurs squelettes carbonés est une différence structurale majeure par rapport à l'acide usnique ; cela laisse envisager une relation structure-activité et des modes d'action différents de ces composés vis-à-vis de la bactérie.

D'une part, de telles chaînes apolaires permettraient une meilleure pénétration des composés dans les parois et membranes bactériennes. Une étude réalisée par modélisation moléculaire au sein du laboratoire a montré que la présence de chaînes lipophiles favoriserait l'ancrage des molécules dans les membranes biologiques (Fabre *et al.*, article en préparation). Les acides didymique et condidymique pourraient induire une déstructuration de la paroi en s'y insérant, et donc avoir un effet bactéricide rapide. D'autre part, bien qu'il puisse déstructurer la membrane et en modifier la perméabilité, il a été démontré dans la littérature que le mode d'action principal de l'acide usnique sur *S. aureus* aurait lieu au niveau intracellulaire, en interférant notamment dans la synthèse d'ARN mais aussi en provoquant l'altération de la synthèse d'ADN (Maciąg-Dorszyńska *et al.*, 2014). Cela pourrait

expliquer l'effet bactéricide plus lent de l'acide usnique par rapport aux acides didymique et condidymique (Figure 128).

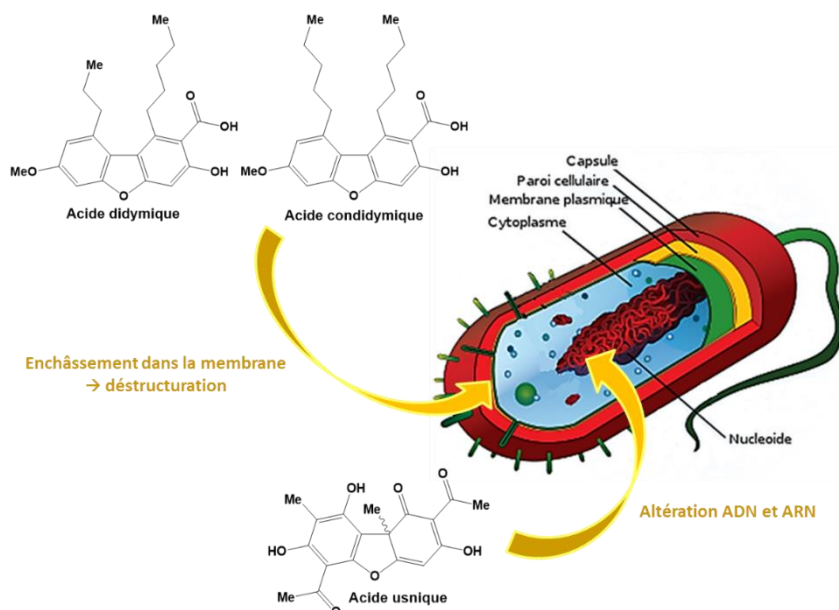


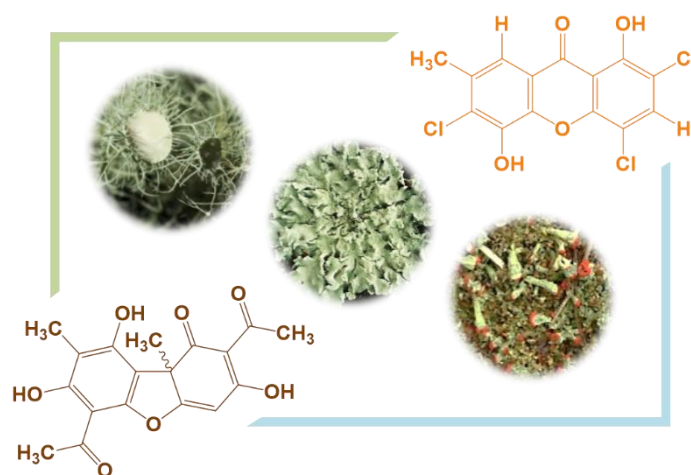
Figure 128 : Modes d'action supposés des acides didymique, condidymique et usnique, sur *S. aureus*. Une déstructuration de la membrane par les acides didymique et condidymique expliquerait leur action bactéricide plus rapide que l'acide usnique, qui lui, interviendrait au niveau intracellulaire en altérant le matériel nucléaire (nucléotide).

La CMI obtenue pour l'acide protocétrarique est conforme à celle décrite dans la littérature. Cependant, aucune zone d'inhibition n'a été observée par bioautographie alors que sa CMI est proche de celle de l'acide capératique, pour lequel l'activité sur *S. aureus* a été détectée sans problème. La technique de bioautographie est sans aucun doute une méthode facile et rapide à mettre en œuvre pour effectuer des screenings et des fractionnements bioguidés. Néanmoins, elle reste une méthode semi-quantitative dont le résultat dépend notamment de la capacité des composés à migrer dans le milieu de culture gélosé. Il est donc indispensable, en particulier pour les composés nouveaux, d'effectuer des tests en milieu liquide plus précis et plus fiables, même si aucune activité n'a été mise en évidence par bioautographie.

Enfin, la cladoxanthone A, composé nouveau identifié au cours de ce travail, s'est révélée active sur *S. aureus* par la technique de bioautographie. Néanmoins, une très faible quantité a été isolée et elle n'a donc pas pu faire l'objet des tests en microplaques. Ainsi, il serait convenable d'en obtenir une masse suffisante afin d'une part, de valider son analyse structurale, et d'autre part de pouvoir déterminer sa concentration minimale inhibitrice sur *S. aureus*. Etant donné qu'il s'agit d'un composé minoritaire isolé d'un lichen peu commun, une partie du travail de thèse a donc été consacrée à la prospection de plusieurs voies de synthèse de cette molécule.

PARTIE C

APPROCHE SYNTHÉTIQUE DE DEUX COMPOSÉS ACTIFS : L'ACIDE USNIQUE & LA CLADOXANTHONE A



Partie C. Approche synthétique de deux composés actifs : l'acide usnique & la cladoxanthone A

D'une part, les deux énantiomères de l'acide usnique ont été isolés à partir des trois espèces de lichen sélectionnées et leur activité vis-à-vis d'une bactérie à Gram positif, *Staphylococcus aureus*, a été démontrée. Ses propriétés biologiques remarquables, et en particulier son activité antibactérienne avérée à faible dose, font de lui un candidat d'intérêt pour une utilisation en tant que conservateur, notamment dans l'industrie cosmétique.

Néanmoins, l'acide usnique extrait présente un caractère potentiellement allergène et les lichens constituent une ressource naturelle à croissance lente, donc facilement épuisable, qu'il convient de préserver. De plus, en fonction des conditions environnementales auxquelles ils sont exposés, la quantité d'acide usnique produite est variable. Un certain nombre d'études s'intéressent donc à la culture contrôlée des lichens (Stocker-Wörgötter, 1991 ; Xang *et al.*, 2010 ; McDonald *et al.*, 2013). Cependant, même si le développement de cultures en bioréacteurs et les manipulations génétiques pourraient faciliter la production de métabolites lichéniques à plus grande échelle (Oksanen, 2006), la culture des lichens n'est, à l'heure actuelle, pas maîtrisée.

La synthèse d'acide usnique permettrait de s'affranchir des limites à son utilisation citées précédemment. A cet effet, très peu de travaux sont reportés dans la littérature, et conduisent à de faibles rendements, alors que de nombreuses références sont disponibles quant à la synthèse et à l'évaluation des activités biologiques de dérivés d'acide usnique.

D'autre part, l'étude phytochimique du lichen *Cladonia incrassata* a conduit à l'isolement, d'un autre composé d'intérêt nommé cladoxanthone A, pour lequel une activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* a été détectée par bioautographie. Il s'agit d'une molécule nouvelle dont la position du groupement méthyle est atypique par rapport aux xanthones couramment décrites dans la littérature. Cette structure originale laisse donc supposer une voie de biosynthèse en marge de celles présentées dans la partie bibliographique.

Cette molécule ayant été isolée en très faible quantité, sa synthèse permettrait d'en obtenir une masse convenable pour ainsi répondre à deux objectifs principaux : la validation de sa structure et l'évaluation de ses activités biologiques.

Ainsi, différentes stratégies ont été prospectées au cours de ce travail et constituent des études préliminaires quant à la synthèse de l'acide usnique et de la cladoxanthone A.

I. SYNTHÈSE DE L'ACIDE USNIQUE

La méthode de préparation actuelle utilisée pour l'acide usnique est son extraction par des solvants organiques, suivie d'une étape de précipitation ou de recristallisation (Sokolov *et al.*, 2012a). Néanmoins, sa synthèse permettrait de s'affranchir de l'utilisation d'extraits naturels potentiellement allergènes, mais également de protéger la ressource lichénique. Si très peu de données bibliographiques sont disponibles concernant la synthèse de l'acide usnique, de nombreuses publications traitent des modifications chimiques de ce composé visant à moduler ses propriétés physicochimiques et ainsi améliorer ses activités biologiques.

I.1. Rappels bibliographiques

I.1.1. Modifications structurales de l'acide usnique

La présence de plusieurs groupements fonctionnels sur sa structure fait de l'acide usnique une molécule plateforme intéressante pour des modifications synthétiques. La plupart des modifications structurales décrites dans la littérature consistent à introduire ou remplacer des groupements fonctionnels, tout en conservant le squelette carboné de l'acide usnique.

Ainsi, des réactions de réduction de la double liaison entre les carbones C4 et C4a, et des fonctions carbonyle peuvent être mises en œuvre (Shoji, 1962 ; Proska *et al.*, 1996 ; Sokolov *et al.*, 2011) (Figure 129).

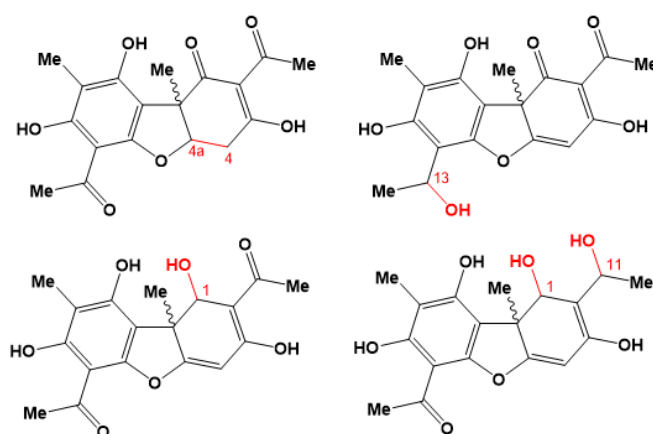


Figure 129 : Réactions de réduction de l'acide usnique.

De plus, le système conjugué formé par les groupements carbonyle sur le squelette carboné confère à l'acide usnique une réactivité vis-à-vis des amines aromatiques et aliphatiques (Kutney et Sanchez, 1976 ; Bruno *et al.*, 2013a) ou encore des polyamines (Bazin *et al.*, 2008). Divers travaux se

sont ainsi intéressés à la synthèse de dérivés amines et énamines afin d'en tester l'activité antibactérienne, cicatrisante, ou encore pour former des dimères capables de complexer des métaux, par réaction avec l'éthylènediamine (Chollet-Krugler *et al.*, 2008) et le (1R, 2R)-1,2-diaminocyclohexane (Legouin *et al.*, 2009) (Figure 130).

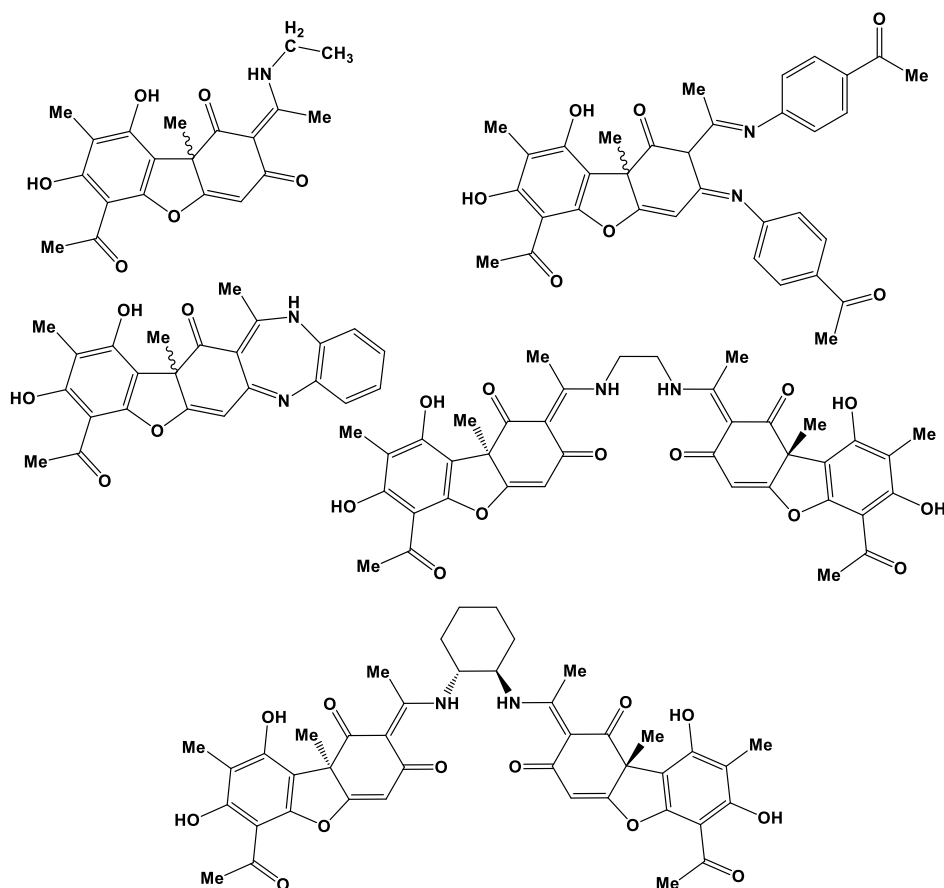


Figure 130 : Dérivés amines et énamines de l'acide usnique.

Des réactions avec la phénylhydrazine ou des phénylhydrazines substituées sont également décrites dans la littérature et conduisent à des dérivés pyrazoles de l'acide usnique (Luzina *et al.*, 2009).

De même, des dérivés chalcones (Sokolov *et al.*, 2011), flavones (Sokolov *et al.*, 2013) et dibenzoylés (Melgarejo *et al.*, 2008) de l'acide usnique sont également reportés. Enfin, des modifications en présence de perfluorooléfines (Furin *et al.*, 2007) sont possibles.

Dans la littérature, de nombreuses études sont donc décrites concernant la modification chimique de l'acide usnique ; à l'inverse, seuls deux travaux majeurs traitent de sa synthèse et proposent des voies biomimétiques au cours desquelles un couplage oxydant est mis en œuvre.

I.1.2. Synthèse de l'acide usnique

Les travaux réalisés par Barton *et al.* (1956) font référence concernant la synthèse de l'acide usnique, qui se déroule en deux étapes (Figure 131). Dans un premier temps, le couplage oxydant de deux molécules de méthylphloroacétophénone, en présence de ferricyanure de potassium et de carbonate de sodium conduit à l'acide hydrousnique (15 %). Dans un second temps, un traitement par l'acide sulfurique concentré permet de déshydrater ce dernier pour obtenir un mélange racémique d'acide usnique (2 %), avec un rendement global de 0,3 %.

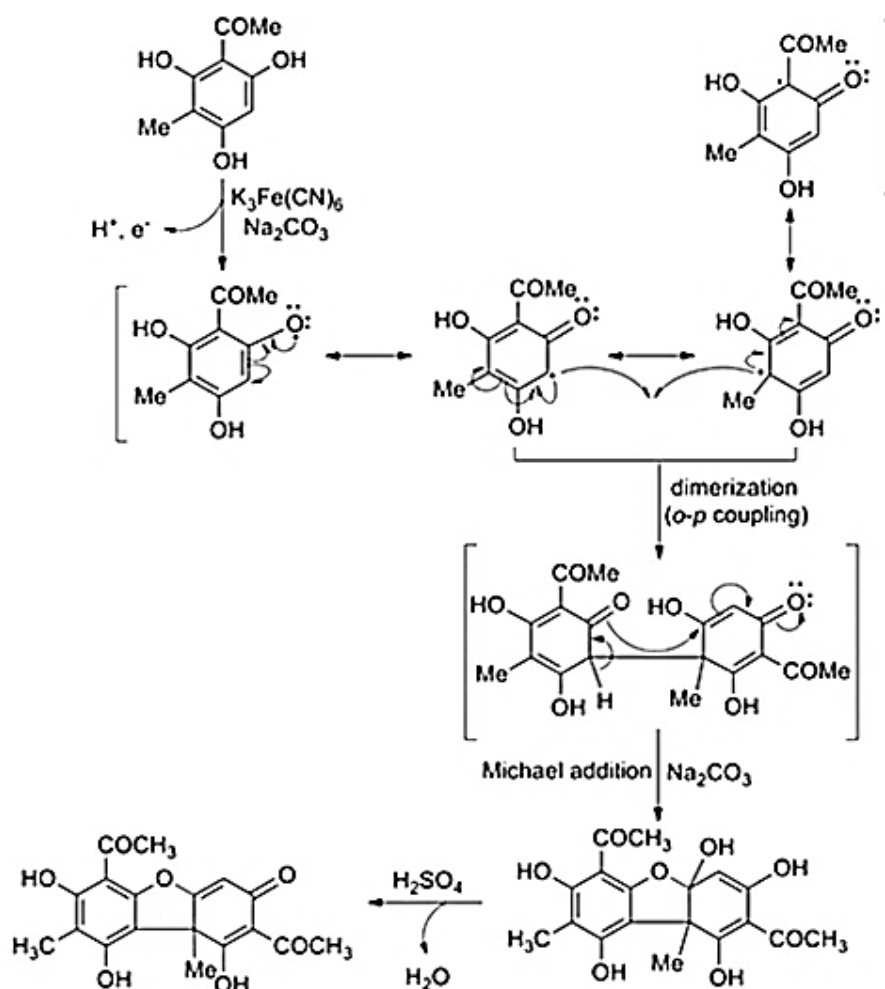


Figure 131 : Synthèse de l'acide usnique par la méthode de Barton *et al.* (1956) (d'après Magoulas et Papaioannou, 2014).

Une décennie plus tard, Penttilä et Fales démontrent que la formation d'acide usnique est possible en présence de peroxydase de raifort (Penttilä et Fales, 1966).

Une publication récente s'appuie sur ces travaux et propose une synthèse biomimétique de l'acide usnique en utilisant une enzyme comme catalyseur (Hawranik *et al.*, 2009). La 2',4',6'-trihydroxyacétophénone commerciale est méthylée, puis la méthylphloroacétophénone obtenue (45

%) est couplée en présence de peroxydase de raifort et de peroxyde d'hydrogène pour former l'acide hydrousnique (40 %). Après déshydratation en milieu acide sulfurique concentré, dans les mêmes conditions que celles décrites par Barton *et al.* (1956), la présence d'acide usnique a été détectée dans le milieu réactionnel (Figure 132). Pour cette méthode, les auteurs ne précisent pas le rendement global de la réaction.

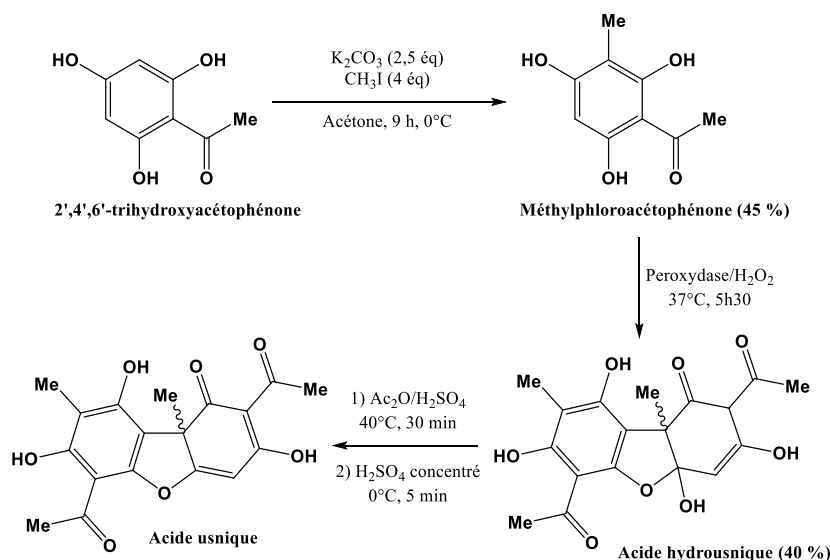


Figure 132 : Synthèse de l'acide usnique selon la méthode de Hawranik *et al* (2009).

A l'image de la voie de biogénèse proposée dans la littérature, les méthodes de synthèse décrites précédemment pour l'acide usnique reposent sur le couplage oxydant de deux molécules de méthylphloracétophénone. Cette dernière n'étant pas commerciale, la première étape de synthèse de l'acide usnique consiste donc en la préparation du précurseur.

I.1.3. Préparation du précurseur : la méthylphloracétophénone

Dans la littérature, deux stratégies de synthèse sont proposées en considérant d'une part, l'acétylation du phloroglucinol suivie de l'étape de méthylation, et d'autre part, la méthylation du phloroglucinol suivie de l'étape d'acétylation (Figure 133).

Concernant la méthylation, celle-ci peut être réalisée soit en une seule étape (méthylation directe), soit en deux étapes (formylation suivie d'une réduction).

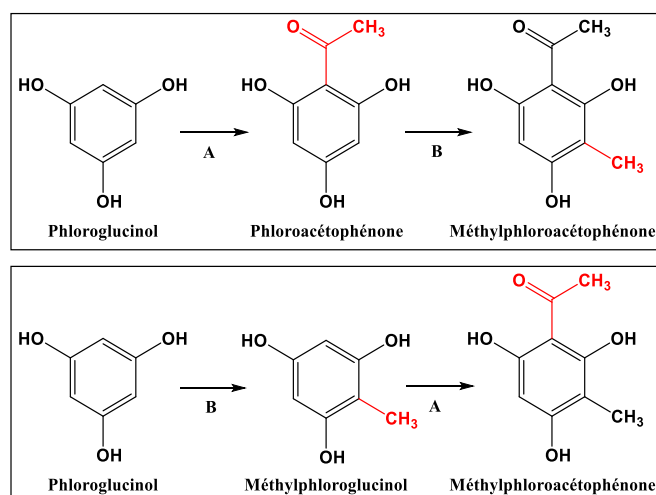


Figure 133 : Stratégies de synthèse de la méthylphloroacétophénone.

Avec A = étape d'acétylation et B = étape de méthylation.

1.1.3.1. Acétylation suivie de la méthylation

- Acétylation du phloroglucinol :

L'acétylation du phloroglucinol, qui conduit à la phloroacétophénone, peut être effectuée selon différentes méthodes décrites dans la littérature. Des acylations de Friedel-Crafts utilisant des chlorures d'acyle ou des anhydrides, ainsi que la réaction de Houben-Hoesch utilisant des nitriles alkylés en présence de chlorure de zinc et d'acide chlorhydrique (Sato *et al.*, 1992 ; Sato *et al.*, 2005 ; rendement non précisé) peuvent être citées (Figure 134). L'acylation du phloroglucinol peut être mise en œuvre en présence de :

- AlCl_3 , CH_3COCl et nitrobenzène (Chauthe *et al.*, 2010 ; 60 %)
- AlCl_3 , CH_3COCl , dichlorométhane et nitrométhane (Reininger et Hartl, 1977 ; 80 %)
- AlCl_3 , CH_3COCl , nitrobenzène, sulfure de carbone (Bharate *et al.*, 2006 ; 70 %)
- Anhydride acétique et trifluorure de bore (Mohanty et Grover, 1988 ; Kulkarni 2012 ; 60 %)

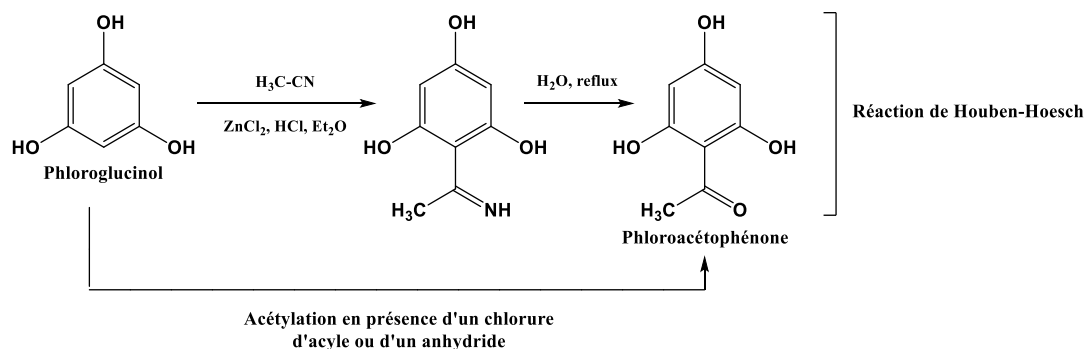


Figure 134 : Méthodes d'obtention de la méthylphloroacétophénone par acétylation du phloroglucinol.

La méthylation de la phloroacétophénone obtenue peut ensuite être effectuée soit en deux étapes (formylation suivie d'une réduction), soit en une seule étape (méthylation directe). Les travaux reportés ont parfois été effectués directement à partir de la phloroacétophénone commerciale.

- Méthylation de la phloroacétophénone en deux étapes :

Une formylation par la réaction de Gattermann est possible en présence de cyanure de zinc, d'acide chlorhydrique gazeux et de chlorure d'aluminium (Shah et Shah, 1939). Enfin, une réduction de type Clemmensen permet l'obtention de la méthylphloroacétophénone attendue (Figure 134).

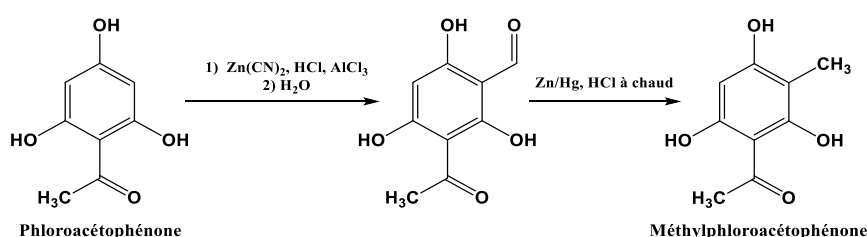


Figure 135 : Obtention de la méthylphloroacétophénone selon le protocole de Shah et Shah (1939).

La stratégie mise en œuvre par Robertson et Whalley (1951) conduit à un rendement global de 26 %. Dans ce cas, la formylation est effectuée en présence de cyanure de zinc dans l'éther anhydre et sous courant d'acide chlorhydrique gazeux mais sans chlorure d'aluminium. La réduction de Clemmensen est enfin réalisée dans un mélange eau-méthanol.

- Méthylation directe de la phloroacétophénone :

Une autre voie de synthèse proposée pour la méthylphloroacétophénone consiste en la méthylation directe de la phloroacétophénone en présence de carbonate de potassium K_2CO_3 et d'iodure de méthyle CH_3I à $0^\circ C$ (Hawranik *et al.*, 2009) (Figure 136).

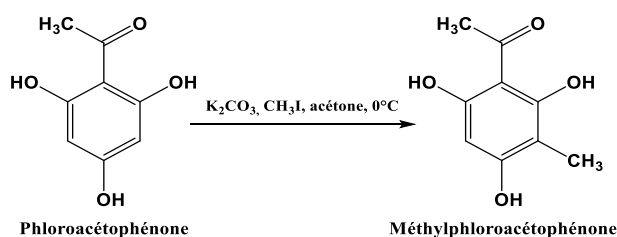


Figure 136 : Obtention de la méthylphloroacétophénone selon le protocole de Hawranik *et al.* (2009).

Les auteurs ont obtenu un rendement de 17 % pour 1 mmol de produit de départ utilisé et de 45 % pour 10 mmol. Le changement d'échelle entraîne donc une amélioration du rendement de la réaction. Dans les deux cas, les coproduits formés sont le résultat de la méthylation des atomes d'oxygène, et jusqu'à 20 % du produit de départ peuvent être récupérés par purification sur colonne de silice (méthanol/dichlorométhane 1/99).

I.1.3.2. Méthylation suivie de l'acétylation

- Méthylation du phloroglucinol :

Dans la littérature, la synthèse du méthylphloroglucinol est reportée à partir de plusieurs composés dont le 3-formyl-2,4,6-trihydroxybenzoate de méthyle (Robertson et Whalley, 1951) et le 2,4,6-trinitrotoluène (Backhouse *et al.*, 1948). En revanche, la méthylation du phloroglucinol n'est que très peu décrite.

On peut néanmoins citer les travaux de Bharate *et al.* (2006) qui décrivent l'obtention du méthylphloroglucinol en deux étapes avec un rendement global de 42 % (Figure 144).

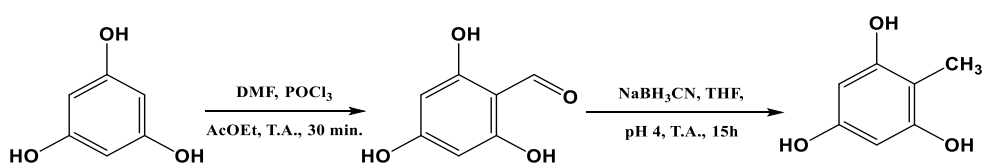


Figure 137 : Synthèse du méthylphloroglucinol à partir du phloroglucinol.

Dans un premier temps, la formylation du phloroglucinol a été effectuée en présence de trichlorure de phosphore et de diméthylformamide anhydre dans l'acétate d'éthyle, à température ambiante. Dans un second temps, la réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde dans le tétrahydrofurane anhydre en présence de cyanoborohydrure de sodium, à pH 4 (par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique à 2 M) et à température ambiante, a conduit au méthylphloroglucinol.

L'acétylation du méthylphloroglucinol obtenu peut ensuite être effectuée par une réaction de type Friedel-Crafts.

- **Acétylation du méthylphloroglucinol :**

Après réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde commercial par le cyanoborohydrure de sodium en milieu acide (rendement : 43 %), Nakagawa-Goto et Lee (2006) ont décrit l'acétylation du méthylphloroglucinol avec un rendement de 75 %, en présence d'acide acétique, d'anhydride acétique et de trifluorure de bore (Figure 138).

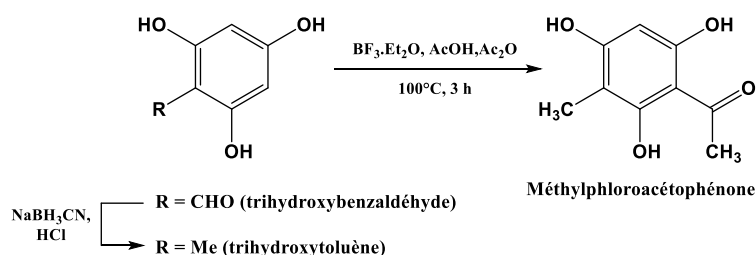


Figure 138 : Obtention de la méthylphloroacétophénone selon le protocole de Nakagawa-Goto et Lee (2006).

Dans leurs travaux, Hawranik *et al.* (2009) se sont basés sur ce protocole et précisent, qu'après la mise en œuvre de différentes conditions opératoires, le produit majoritaire obtenu n'est pas la méthylphloroacétophénone mais le résultat d'une double acétylation du cycle aromatique.

L'étude bibliographique concernant l'acide usnique révèle donc un contraste saisissant entre la diversité de publications disponibles sur les modifications structurales de ce composé et le nombre de travaux traitant de sa synthèse.

Loin d'être triviale, la synthèse de ce composé nécessite l'obtention du précurseur, la méthylphloroacétophénone, en quantité suffisante afin d'expérimenter différentes conditions de couplage pour conduire à l'acide hydrousnique, puis par déshydratation à l'acide usnique.

I.2. Objectif du travail et stratégie de synthèse

Comme évoqué précédemment, l'acide usnique ainsi que les dérivés obtenus par modifications structurales de ce dernier présentent des propriétés biologiques d'intérêt. La synthèse de ce composé permettrait de protéger la ressource lichénique et de s'affranchir du caractère potentiellement allergène que représente l'utilisation d'extraits naturels.

L'objectif est ici d'explorer une voie de synthèse originale, en proposant d'une part, d'optimiser la préparation du précurseur, et d'autre part, de proposer une méthode de couplage innovante, basée sur l'utilisation d'un catalyseur tétrapyrrolique de type porphyrine (Figure 139).

La stratégie mise en œuvre au cours de ce travail repose donc sur deux aspects. Dans un premier temps, de nouvelles approches ont été mises en œuvre pour la synthèse de la méthylphloroacétophénone à partir de composés commerciaux : le phloroglucinol et la phloroacétophénone. Dans un second temps, le couplage oxydant entre deux molécules de méthylphloroacétophénone a été envisagé *via* l'utilisation d'une *méso*-arylporphyrine commerciale.

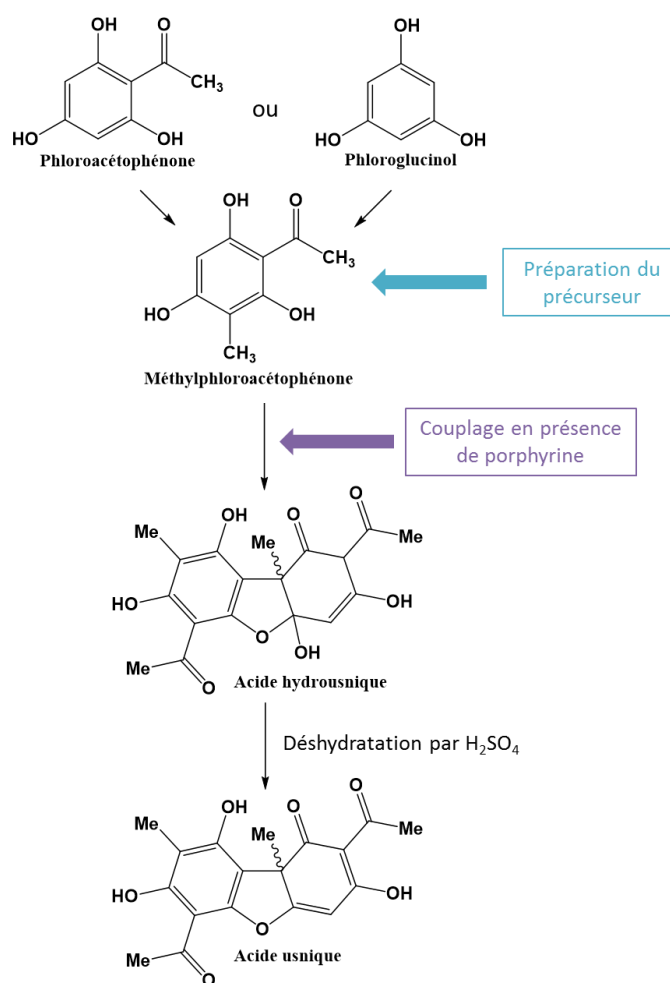


Figure 139 : Voie de synthèse envisagée pour l'acide usnique.

I.3. Obtention de la méthylphloroacétophénone

Dans le cadre de cette étude, nous avons concentré nos efforts en particulier sur la synthèse de la méthylphloroacétophénone. Il s'agissait d'envisager des conditions opératoires compatibles avec une potentielle utilisation dans l'industrie cosmétique. Une attention particulière a donc été portée sur le choix des réactifs et l'optimisation des réactions.

La méthylphloroacétophénone a été obtenue en trois étapes à partir du phloroglucinol (stratégie S1), mais également à partir de la phloroacétophénone commerciale en deux étapes (stratégie S2) ou par méthylation directe (stratégie S3) (Figure 140).

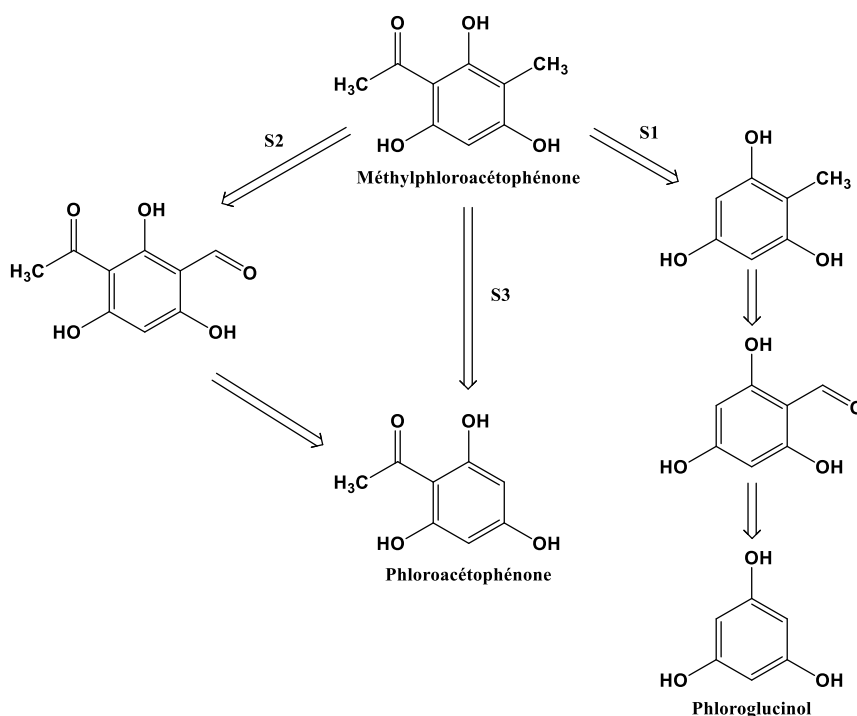


Figure 140 : Stratégies proposées pour la synthèse de la méthylphloroacétophénone.

La première stratégie de synthèse (S1) a été réalisée à partir du phloroglucinol commercial, molécule classiquement utilisée comme antispasmodique (dans le Spasfon® par exemple), qui présente l'avantage d'être facilement accessible et peu coûteux.

1.3.1. Synthèse à partir du phloroglucinol : stratégie S1

Si la stratégie de synthèse proposée par Sato *et al.* (1992) permet l'obtention du composé attendu avec un rendement acceptable (42,5 %), elle implique néanmoins l'utilisation de réactifs dangereux nécessitant des précautions d'emploi particulières. Nous avons donc envisagé une stratégie employant des protocoles moins contraignants à mettre en œuvre.

La formation de la méthylphloroacétophénone à partir du phloroglucinol a été effectuée en trois étapes, avec un rendement global de 23,5 % :

- Formylation du phloroglucinol conduisant au 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (**1**) ;
- Réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde en méthylphloroglucinol (**2**) ;
- Acétylation du méthylphloroglucinol pour former la méthylphloroacétophénone (**3**).

I.3.1.1. Formylation du phloroglucinol

Dans le cadre de ce travail, la réaction de Gatterman n'a pas été mise en œuvre pour s'affranchir de l'utilisation de cyanure de zinc et d'acide chlorhydrique gazeux. La synthèse du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde a donc été effectuée *via* une réaction de Vilsmeier-Haack, plus simple à mettre en œuvre. De plus, cette formylation a été réalisée avant l'étape d'acétylation afin d'éviter la formation potentielle d'une chromone ; en effet, dans les conditions opératoires d'une réaction de Vilsmeier-Haack, la présence d'un groupe acétyle en position *ortho* d'un groupement hydroxyle peut conduire à une cyclisation (Wang *et al.*, 2008) (Figure 141).

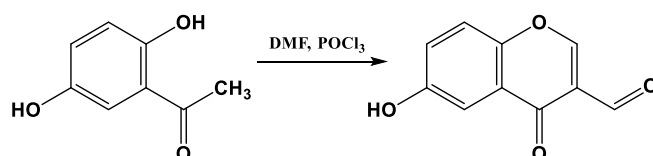


Figure 141 : Formation d'une chromone lors d'une formylation de type de Vilsmeier-Haack (Wang *et al.*, 2008).

La formylation a été effectuée sur le phloroglucinol en présence de trichlorure de phosphore et de diméthylformamide anhydre dans l'acétate d'éthyle, à température ambiante (adapté de Bharate *et al.*, 2006) (Figure 143).

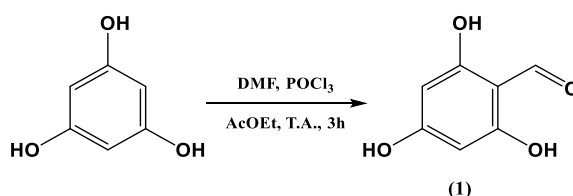


Figure 142 : Formylation du phloroglucinol.

Tout d'abord, le diméthylformamide (1 éq.) et le trichlorure de phosphore (1 éq.) ont été mis à réagir pour former l'intermédiaire iminium chloré (a). Celui-ci a ensuite été ajouté goutte à goutte au phloroglucinol, solubilisé dans l'acétate d'éthyle, pour donner l'intermédiaire iminium (b) (Figure 143). La formation d'un précipité a été observée presque instantanément lors de l'ajout.

Après trois heures de réaction à température ambiante, la filtration du précipité suivie d'une recristallisation dans l'eau, qui permet l'hydrolyse de l'intermédiaire (b), a conduit à l'obtention du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (**1**) pur.

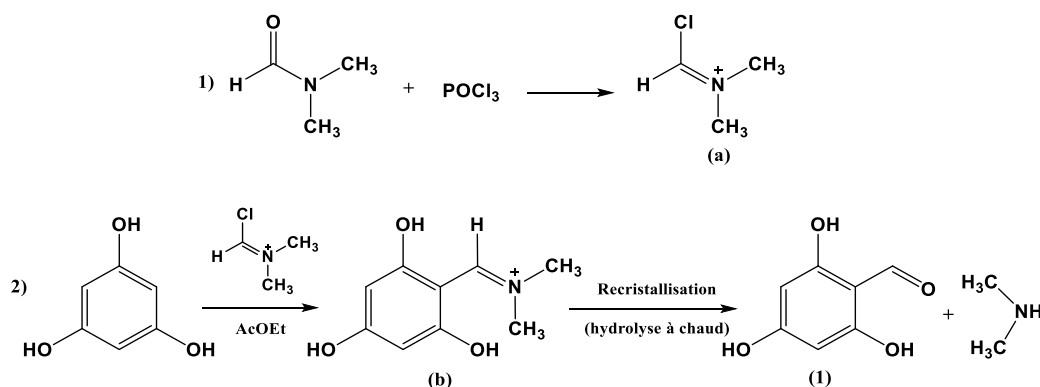


Figure 143 : Synthèse du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (1) par formylation du phloroglucinol.

Le produit attendu a été obtenu avec un rendement de 70 %, comparable à la littérature. Le filtrat résiduel contient le phloroglucinol de départ n'ayant pas réagi.

Dans le cadre de ce travail, nous avons cherché à optimiser l'étape de purification du produit. Ainsi, l'hydrolyse a été conduite simultanément à la recrystallisation dans l'eau. Cette mise au point a permis la purification rapide du composé formylé par rapport à la méthode de référence. En effet, selon le protocole mis en œuvre par Bharate *et al.* (2006), l'hydrolyse est effectuée à froid puis une extraction par l'acétate d'éthyle suivie d'une purification sur gel de silice conduisent à l'obtention du composé formylé.

I.3.1.2. Réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde

Le méthylphloroglucinol (2) a été obtenu par réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (1) dans le tétrahydrofur anhydre en présence de cyanoborohydrure de sodium et d'une solution d'acide chlorhydrique à 2 M, à température ambiante (adapté de Bharate *et al.*, 2006) (Figure 144).

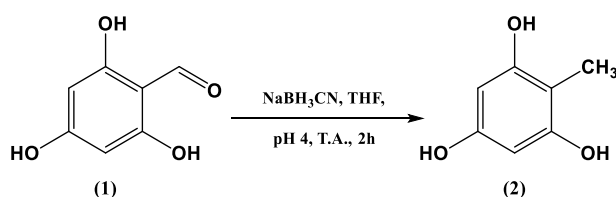


Figure 144 : Réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (1) en méthylphloroglucinol (2).

Le cyanoborohydrure de sodium est classiquement employé pour la réduction en milieu acide des aldéhydes et cétones en alcools, ou encore pour les réactions d'amination réductrice. Cependant, son utilisation en milieu acide peut également permettre l'introduction d'un groupe méthyle, en *ortho* ou *para* d'un hydroxyle d'un phénol, par réduction d'une fonction aldéhyde. C'est pourquoi le milieu

réactionnel est maintenu à pH 4 par ajouts réguliers de HCl 2 M, afin d'assurer le bon déroulement de la réaction. Le mécanisme proposé pour cette réaction est présenté sur la Figure 145. Après réduction de la fonction aldéhyde en alcool primaire, une déshydratation en milieu acide conduirait à la formation d'un intermédiaire de type quinométhane. Enfin, l'attaque d'un hydrure (provenant du NaBH_3CN en excès) permettrait le retour à l'aromaticité pour former le méthylphloroglucinol.

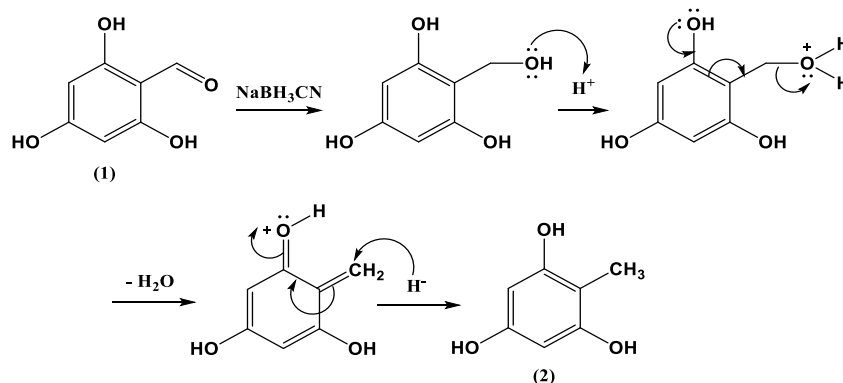


Figure 145 : Mécanisme réactionnel proposé pour la réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde en méthylphloroglucinol.

Différentes conditions opératoires ont été mises en œuvre à température ambiante et dans tous les cas, la disparition totale du produit de départ est observée, par analyse par chromatographie sur couche mince, dès la première heure de réaction.

Après purification par chromatographie éclair, le produit attendu a été obtenu avec un rendement de 50 % dans le meilleur des cas, c'est-à-dire lorsque la réaction est conduite en présence de 5 équivalents de cyanoborohydrure de sodium pendant deux heures. Par rapport aux conditions décrites par Bharate *et al.* (2006) (3 éq. NaBH_3CN , 15 h, 60 % de rendement), l'augmentation de la quantité de NaBH_3CN permet, dans notre cas, d'obtenir un rendement proche en diminuant considérablement le temps de réaction.

Le coproduit formé lors de cette réaction a également été isolé lors de la purification par chromatographie éclair. Son analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif a mis en évidence un ion moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 279,0863 correspondant à la formule brute $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_6$ et la présence de 8 insaturations. Cette masse élevée ainsi que le nombre d'insaturations suggère une structure compatible avec un couplage de deux cycles aromatiques substitués. Le spectre de masse présente des fragments à m/z 153,0543 ; 141,0545 ; 139,0388 et 127,0388 (Figure 146).

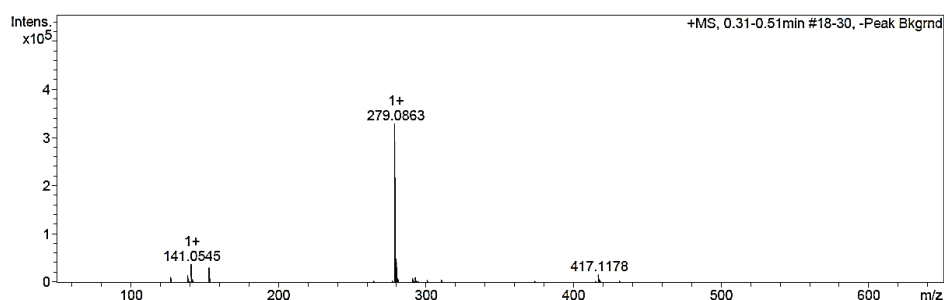


Figure 146 : Spectre de masse haute résolution du coproduit formé lors de la réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde en méthylphloroglucinol.

L'analyse des fragments obtenus a permis de proposer la structure présentée sur la Figure 147 et correspondant au 2-méthyl-4-(2',4',6'-trihydroxybenzyl)benzène-1,3,5-triol. Une analyse par RMN ^1H a également confirmé la structure et mis en évidence la présence de :

- 8 fonctions hydroxyle à 9,97 (s, 2H, OH-2', OH-6') ; 9,53 ; 9,05 ; 8,87 et 8,55 ppm.
- 3 protons aromatiques à 5,96 (s, 1H, H-6) et 5,86 ppm (s, 2H, H-3' et H-5').
- 1 groupe méthylène à 3,50 ppm (s, 2H, CH₂-8).
- 1 groupement méthyle à 1,86 ppm (s, 3H, CH₃-7).

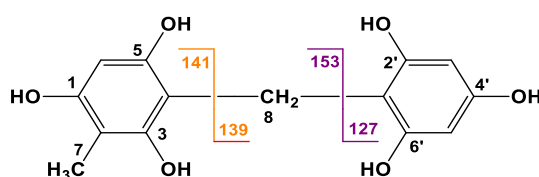


Figure 147 : Fragments obtenus et structure supposée du coproduit formé lors de la réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde en méthylphloroglucinol.

La réaction de réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde a donc conduit à la formation de deux produits, à hauteur de 50 % chacun : le méthylphloroglucinol attendu (A), ainsi qu'un coproduit issu d'un couplage entre le méthylphloroglucinol formé et l'intermédiaire quinométhane (C). D'un point de vue mécanistique, un schéma réactionnel, présenté sur la Figure 148, a été envisagé afin d'expliquer la formation de ce coproduit.

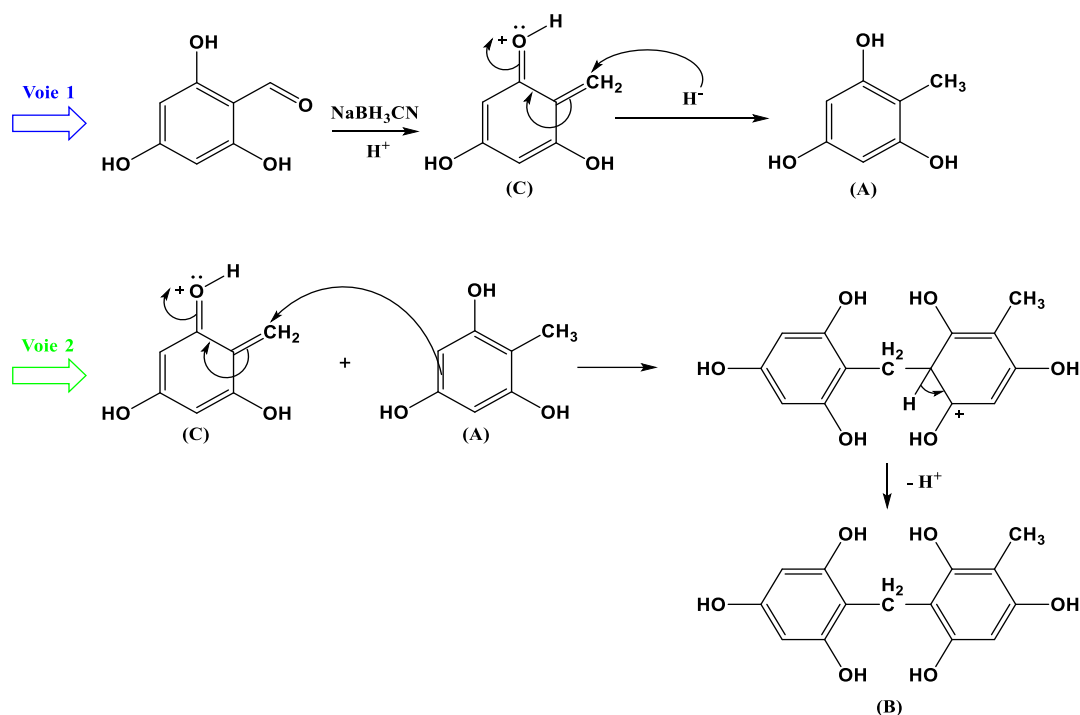


Figure 148 : Proposition de mécanisme conduisant au coproduit de la réaction de réduction.

Au cours de la réaction, l'action d'un hydrure sur l'intermédiaire quinométhane (noté C) conduit à la formation du méthylphloroglucinol (noté A) (voie 1, en bleu), ce qui correspond au mécanisme proposé précédemment pour la réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde en présence de cyanoborohydrure de sodium et à pH acide (environ 4).

La voie 2 (en vert) est celle proposée pour la formation du coproduit (noté B). Au cours de la réaction de réduction, une addition électrophile pourrait avoir lieu entre l'intermédiaire quinométhane et le méthylphloroglucinol formé (lors de la voie 1) conduisant ainsi à l'obtention du composé B. Les deux voies se produiraient simultanément dans le milieu réactionnel, et il y aurait donc compétition entre l'attaque de l'hydrure sur l'intermédiaire quinométhane (voie 1) et l'addition électrophile du méthylphloroglucinol sur ce même intermédiaire (voie 2).

Enfin, un essai de réduction du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde a été effectué sans maintien du milieu réactionnel à pH 4. Celui-ci a conduit à un faible rendement de 5 %, ce qui semble confirmer l'importance de l'étape de protonation dans la formation de l'intermédiaire quinométhane.

1.3.1.3. Acétylation du méthylphloroglucinol

Rappelons que, dans la littérature, l'acétylation du phloroglucinol est parfois conduite dans des conditions incompatibles avec une utilisation en industrie cosmétique (chlorure de zinc, sulfure de carbone, nitrobenzène et nitrométhane notamment).

Dans le cas de l'acétylation du méthylphloroglucinol, nous avons donc opté pour une méthode plus douce et plus classique en présence d'un acide de Lewis et d'anhydride acétique (Figure 149).

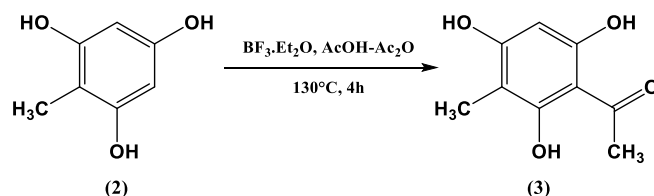


Figure 149 : Synthèse de la méthylphloroacétophénone (3) par acétylation du méthylphloroglucinol (2).

Sur la base des travaux de Nakagawa-Goto et Lee (2006), l'acétylation du méthylphloroglucinol obtenu (2) a été conduite dans l'acide acétique en présence d'anhydride acétique (1,2 éq.) et d'un catalyseur acide, le trifluorure de bore ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) (1,2 éq.).

La réaction a été stoppée par ajout d'eau après 4 heures à reflux (130°C). Puis, des extractions par l'acétate d'éthyle et un lavage par une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium ont été effectués. Après purification par chromatographie éclair, la méthylphloroacétophénone attendue (3) a été obtenue avec un rendement maximum de 70 %, comparable à celui obtenu par les auteurs.

Le coproduit formé au cours de cette réaction a également été identifié : il s'agit du composé diacétylé, pour lequel l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif a mis en évidence un ion moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^+$ à m/z 223,0610 correspondant à la formule brute $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$ (Figure 150). L'analyse par RMN ^1H a notamment mis en évidence l'absence de proton aromatique, ainsi que la présence d'un signal à 2,64 ppm intégrant pour 6 protons, caractéristique des méthyle des deux groupements acétyle. Aussi, une analyse par RMN ^{13}C a montré la présence d'un signal à 32,8 ppm correspondant aux carbones des méthyle des groupements acétyle.

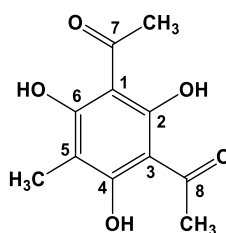


Figure 150 : Composé diacétylé formé au cours de la réaction d'acétylation du méthylphloroglucinol.

Les déplacements chimiques obtenus par RMN ^1H et ^{13}C , dans le diméthylsulfoxyde deutéré, sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz) pour le composé diacétylé (dans DMSO- d_6).

No.	^1H	^{13}C
1		103,9 C
2		166,4 C
3		103,9 C
4		169,0 C
5		102,0 C
6		169,0 C
7		203,9 C
8		203,9 C
CH ₃ -5	1,95 s	7,6 CH ₃
CH ₃ -7	2,64 s	32,8 CH ₃
CH ₃ -8	2,64 s	32,8 CH ₃
OH-2	16,0 br s	
OH-4	13,0 br s	
OH-6	13,0 br s	

s : singulet ; br s : singulet élargi.

La stratégie S1 a permis d'obtenir la méthylphloroacétophénone en trois étapes avec un rendement de réaction global de 23,5 %. Bien qu'il soit inférieur à celui reporté par Sato *et al.* (2005) (42,5 %), la voie de synthèse mise en œuvre au cours de ce travail implique l'utilisation de réactifs moins dangereux et des conditions plus douces.

Pour les deux stratégies suivantes (S2 et S3), l'utilisation de phloroacétophénone commerciale a permis de s'affranchir des conditions difficiles de l'étape d'acétylation. Elles reposent donc sur l'introduction d'un groupement méthyle afin d'obtenir la méthylphloroacétophénone.

I.3.2. Synthèse à partir de la phloroacétophénone

La synthèse de la méthylphloroacétophénone a donc été effectuée selon deux stratégies à partir de la phloroacétophénone commerciale :

- D'une part, une méthylation en deux étapes consistant en une formylation suivie d'une réduction (stratégie S2) ;
- D'autre part, une méthylation directe par l'iodométhane (stratégie S3).

I.3.2.1. Stratégie S2

I.3.2.1.a. Formylation de la phloroacétophénone

Une formylation de type Vilsmeier-Haack a été effectuée sur la phloroacétophénone commerciale en présence de trichlorure de phosphore et de diméthylformamide anhydre dans l'acétate d'éthyle (Figure 151).

Un premier essai a été réalisé en présence de POCl_3 et DMF dans les conditions stoechiométriques (1 éq.) ; l'apparition d'un précipité a été observée après 48 heures à température ambiante. Un second essai en présence de 1,5 équivalent de POCl_3 et 1,5 équivalent de DMF a conduit à l'obtention d'un précipité après 24 heures de réaction à température ambiante.

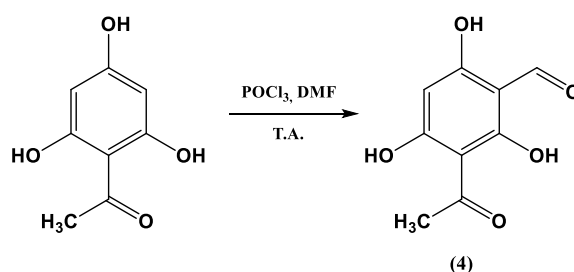


Figure 151 : Synthèse du 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (4) par formylation de la phloroacétophénone.

Dans les deux cas, le traitement effectué en fin de réaction est le même que celui appliqué au 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde ; la filtration du précipité suivie d'une recristallisation dans l'eau ont conduit au 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (4) avec un rendement de 30 % pour le premier essai et de 43 % pour le second, soit des rendements 2,3 à 1,7 fois inférieurs à ceux obtenus lors de la formylation du phloroglucinol (70 %). Le filtrat résiduel contient la phloroacétophénone de départ n'ayant pas réagi.

Par rapport au phloroglucinol, la présence d'un groupement acétyle sur la phloroacétophénone semble donc être défavorable à la réaction de formylation. Ceci peut s'expliquer notamment par son effet mésomère attracteur désactivant sur le cycle, par rapport à l'effet mésomère donneur des fonctions hydroxyle.

I.3.2.1.b. Réduction du 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde

La réduction de la fonction aldéhyde en groupement méthyle a été effectuée en présence de NaBH_3CN (5 éq.) et d'une solution d'acide chlorhydrique à 2 M, dans le THF anhydre et à température ambiante. Le milieu a été maintenu à pH 4 pendant toute la durée de la réaction (Figure 152).

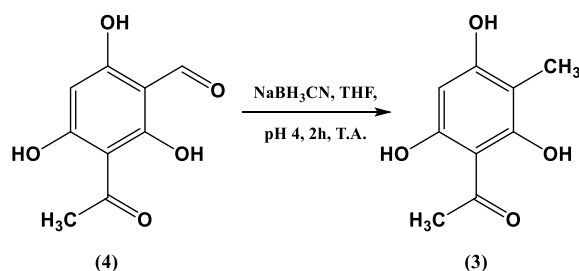


Figure 152 : Synthèse de la méthylphloroacétophénone (3) par réduction du 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (4).

Après deux heures de réaction, la purification a été effectuée par chromatographie préparative sur plaques de gel de silice. La méthylphloroacétophénone attendue (3) a été obtenue avec un rendement de 21,5 %, soit un rendement plus de 2 fois inférieur à celui de la réduction du trihydroxybenzaldéhyde en méthylphloroglucinol (50 %).

Comme pour la réaction de formylation, la présence du groupement acétyle semble être en défaveur de la réduction du groupement aldéhyde. Il se produit très probablement une compétition pour la réduction des carbonyles portés par ces deux groupements. De ce fait, les coproduits observés par analyse par chromatographie sur couche mince correspondent très certainement aux produits issus de la réduction des carbonyles en alcools voire d'une désoxygénation complète.

Dans le meilleur des cas, la stratégie S2 a donc permis d'obtenir la méthylphloroacétophénone en deux étapes (formylation suivie d'une réduction) avec un faible rendement de réaction de 9 %.

1.3.2.2. Stratégie S3 : méthylation par l'iodométhane

Dans leurs travaux, Hawranik *et al.* (2009) proposent une voie de méthylation directe de la phloroacétophénone utilisant l'iodométhane et le carbonate de potassium. Afin de s'affranchir des problèmes d'hétérogénéité liés à la présence de ce dernier, nous avons choisi de mener la méthylation directe de la phloroacétophénone (préalablement lyophilisée) par l'iodométhane (5 éq.) en présence d'une solution de méthanolate de sodium (CH_3ONa) (1 éq.) (Figure 153). La réaction a été conduite dans le méthanol anhydre sous flux d'argon, à 0°C pendant 45 heures.

Après évaporation à sec du milieu réactionnel, la purification par chromatographie éclair en phase inverse (gel de silice greffé C_{18}) a conduit à l'obtention du composé attendu (3) avec un rendement de 43 %, similaire à celui reporté par Hawranik *et al.* (2009), et à la récupération du produit de départ n'ayant pas réagi. De même que pour ces auteurs, un effet de masse a été observé pour cette réaction ; des rendements croissants ont été obtenus avec l'augmentation du nombre de moles de phloroacétophénone engagé dans la réaction (30 % de rendement pour 5,4 mmol contre 43 % de rendement pour 29,7 mmol).

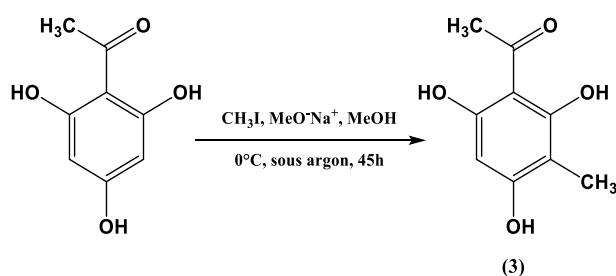


Figure 153 : Synthèse de la méthylphloroacétophénone (3) par méthylation directe de la phloroacétophénone.

Cette méthode présente un avantage majeur par rapport à celle utilisant le carbonate de potassium, pour laquelle la formation de coproduits résultant de la méthylation des atomes d'oxygène a été mise en évidence (Hawranik *et al.*, 2009). En effet, dans notre cas, la méthylation s'effectue uniquement sur le cycle et ne touche pas les oxygènes. Les produits méthoxylés ne sont donc pas obtenus, le brut réactionnel étant constitué de la phloroacétophénone de départ et de la méthylphloroacétophénone attendue. La purification en est ainsi facilitée, le produit de départ récupéré pouvant être engagé dans une nouvelle réaction de méthylation.

I.3.3. Discussion - conclusion

Au cours de ce travail, la synthèse de la méthylphloroacétophénone a été envisagée selon trois stratégies à partir de composés commerciaux : le phloroglucinol et la phloroacétophénone.

L'étape de formylation, commune aux voies de synthèse S1 et S2, a fait l'objet d'un traitement plus simple et plus rapide à mettre en oeuvre que celui présenté dans la littérature (hydrolyse à froid suivie d'une extraction par l'acétate d'éthyle puis d'une purification sur gel de silice) (Bharate *et al.*, 2006). En effet, une recristallisation dans l'eau a permis de réaliser simultanément l'hydrolyse de l'intermédiaire réactionnel et la purification des composés attendus. Cependant, contrairement au phloroglucinol, des rendements en moyenne deux fois plus faibles ont été mis en évidence dans le cas de la formylation de la phloroacétophénone.

Pour les stratégies S1 et S2, la réduction de la fonction aldéhyde en méthyle a été effectuée en présence de cyanoborohydrure de sodium et à pH maintenu à 4. Il s'agit de l'étape limitante de ces deux voies de synthèse avec des rendements respectifs pour S1 et S2 de 50 % et 21,5 %.

L'acétylation du méthylphloroglucinol (stratégie S1), effectuée dans l'acide acétique en présence de trifluorure de bore et d'anhydride acétique, a conduit à l'obtention de la méthylphloroacétophénone souhaitée avec un rendement optimal de 70 %, conforme à la littérature (75 % : Nakagawa-Goto et Lee, 2006).

Enfin, la méthylation directe de la phloroacétophénone par l'iodométhane en présence de méthanolate de sodium a conduit à l'obtention de la méthylphloroacétophénone avec un rendement de 43 %. Avec un rendement similaire à la littérature, cette méthode permet de méthyler sélectivement les carbones du cycle, sans toucher aux oxygènes, contrairement à ce qui est observé en présence de carbonate de potassium (formation de composés méthoxylés) (Hawranik *et al.*, 2009).

Les rendements obtenus ainsi que le nombre d'étapes mises en œuvre pour chaque voie de synthèse sont reportés dans le Tableau 18 ci-après.

Tableau 18 : Rendements obtenus et nombre d'étapes pour les stratégies de synthèse S1, S2 et S3.

Stratégie	Composé de départ	Nombre d'étapes	Rendement global
S1	Phloroglucinol	3 (formylation - réduction - acétylation)	23,5 %
S2	Phloroacétophénone	2 (formylation - réduction)	9 %
S3	Phloroacétophénone	1 (méthylation)	43 %

La stratégie S2, qui se déroule en deux étapes, est celle qui a conduit au rendement le plus faible (9 %), qui se trouve être plus de deux fois inférieur à celui obtenu par la stratégie S1 (23,5 %), effectuée en trois étapes. La méthylation directe de la phloroacétophénone (S3) est la stratégie qui fournit le meilleur rendement, en une seule étape, et à l'issue de laquelle le composé de départ peut être récupéré et réutilisé. C'est donc cette méthode qui a été utilisée pour accumuler suffisamment de précurseur (méthylphloroacétophénone) pour les essais de couplage présentés ci-après.

I.4. Réaction de couplage oxydant

La stratégie de synthèse impliquant la méthylation directe de la phloroacétophénone a été choisie pour préparer et accumuler une masse suffisante de méthylphloroacétophénone en vue d'effectuer les tests de couplage. Comme cela est décrit pour la voie de biosynthèse, rappelons qu'il est possible d'obtenir un dimère qui par déshydratation, conduit à l'acide usnique.

Le couplage de deux molécules de méthylphloroacétophénone implique un mécanisme radicalaire qui nécessite en premier lieu le choix d'un catalyseur adapté.

I.4.1. Choix du catalyseur

Les métalloenzymes naturelles possèdent un groupement prosthétique (non protéique) constitué d'un ion métallique complexé par une porphyrine. C'est le cas par exemple de l'hémoglobine, dont l'hème correspond à un ion fer complexé par une porphyrine. On peut également citer une autre métalloporphyrine naturelle, la peroxydase de raifort, dont le groupement prosthétique est également une porphyrine métallée au fer (Figure 154). L'atome de fer est penta-coordonné avec les quatre atomes d'azote du noyau porphyrinique, mais également avec un groupement histidine porté par la protéine (le fer forme une liaison avec le doublet non liant de l'azote de la fonction imidazole provenant de l'acide aminé) (Vidossich et Magistrato, 2014).

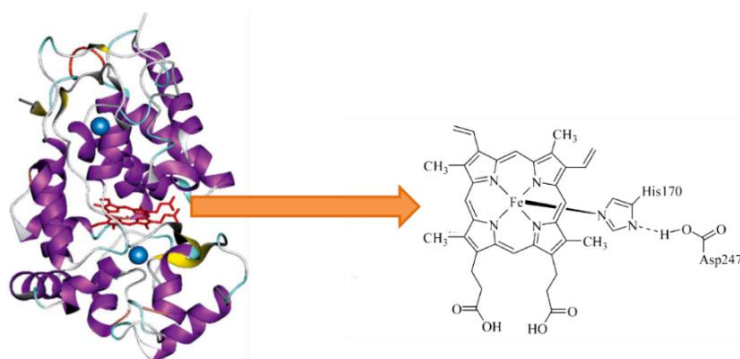


Figure 154 : Structure tridimensionnelle et groupement prosthétique de la peroxydase de raifort (d'après Veitch, 2004).

His170 : histidine = ligand proximal du fer ; Asp247 : asparagine = sa fonction acide carboxylique stabilise le noyau imidazole de His170 par liaison hydrogène.

Cette enzyme a été utilisée par Hawranik *et al.* (2009) pour le couplage oxydant de deux molécules de méthylphloroacétophénone ; l'acide hydrousnique a été obtenu avec un rendement de 40 % plus de 2,5 fois supérieur à celui de Barton *et al.* (1956) obtenu avec le ferricyanure de potassium (15 %). L'utilisation d'une porphyrine métallée au fer comme catalyseur de la réaction de couplage pourrait donc permettre de se rapprocher de l'activité d'une métalloenzyme naturelle.

Aussi, certains travaux reportés dans la littérature présentent la possibilité d'effectuer des couplages oxydants catalysés par des porphyrines. En effet, celles-ci sont capables, en présence d'un agent oxydant, d'induire la formation de radicaux libres permettant ainsi des réactions de couplage.

Des études ont mis en évidence que l'emploi de porphyrines, en présence de peroxyde d'hydrogène ou de dioxygène, conduit au couplage oxydant carbone-carbone de phénols. Par exemple, des produits de couplage ont été observés dans le cas de monomères phénoliques (acides humiques) en présence de méso-tétra-(2,6-dichloro-3-sulfo)phénylporphyrines de fer ou de manganèse (Figure 155) avec comme agent oxydant le peroxyde d'hydrogène, ou le dioxygène et la lumière (polymérisation photoxydative), à température ambiante (Šmejkalová et Piccolo, 2005 ; Šmejkalová et Piccolo, 2006).

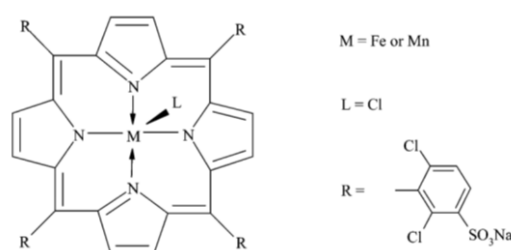


Figure 155 : Structure des porphyrines métallées au fer ou au manganèse utilisées pour le couplage de phénols (Šmejkalová et Piccolo, 2005).

Une autre étude réalisée sur le 4-méthylguaïacol et les conditions de couplage ont été optimisées en présence de porphyrines métallées au cobalt, d'une base, et sous dioxygène (Jiang *et al.*, 2013). Les meilleurs rendements (98 %) ont été obtenus en présence d'une quantité catalytique de porphyrine, 1 équivalent de Na_2CO_3 , à 60°C, sous pression de dioxygène et dans le mélange méthanol/eau (4/1). Des essais menés sur d'autres phénols mono- et disubstitués (**1**) ont également démontré la faisabilité de couplages carbone-carbone *ortho-ortho* ou *para-para* (**2**) dans ces mêmes conditions, avec des rendements compris entre 41 et 95 % (Figure 156).

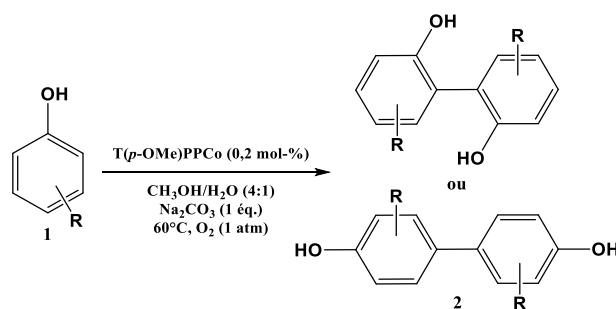


Figure 156 : Couplage oxydant de phénols en présence d'une porphyrine métallée au cobalt, d'une base, à chaud et sous pression de dioxygène (Jiang *et al.*, 2013).

Des travaux antérieurs effectués au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles ont apporté des résultats encourageants quant à l'utilisation de phtalocyanines métallées au fer ou au manganèse pour coupler la méthylphloroacétophénone. Cependant, la dégradation du catalyseur a été observée au cours des réactions. C'est pourquoi, dans le cadre de ce travail, une porphyrine octachlorée métallée au fer a été sélectionnée afin de mettre en œuvre un couplage biomimétique.

En effet, la présence de groupements encombrants en *ortho* des groupements phényles (ici les atomes de chlore), et donc orientés au-dessus du macrocycle, a deux avantages majeurs (Renault, 2014). D'une part, elle renforce la stabilité de la *méso*-arylporphyrine en milieu oxydant, en protégeant les positions *méso* des additions d'espèces radicalaires de l'oxygène à l'origine de l'ouverture et de la dégradation du macrocycle. D'autre part, elle permet d'augmenter son pouvoir catalytique en évitant la formation de dimères μ -oxo (Figure 157).

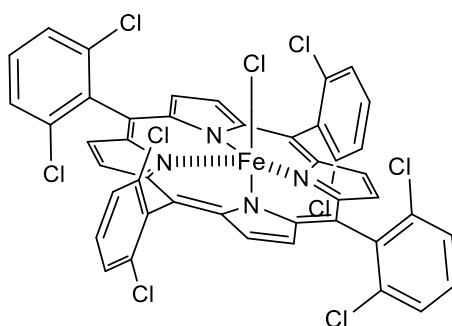


Figure 157 : Structure de la tétra(dichloro-phényl)porphyrine utilisée pour le couplage de la méthylphloroacétophénone.

Dans le cadre de la synthèse de l'acide usnique, nous avons donc étudié le couplage de deux molécules de méthylphloroacétophénone, assisté par une porphyrine octachlorée métallée au fer, en présence soit de peroxyde d'hydrogène, de dioxygène et de lumière, ou encore de dioxygène et d'une base.

Dans un premier temps, le protocole de Barton *et al.* (1956) utilisant le ferricyanure de potassium et le carbonate de sodium a été mis en œuvre. La formation des acides hydrousnique et usnique a été détectée par analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM). Le brut réactionnel obtenu, et en particulier le temps de rétention et le spectre de masse de l'acide hydrousnique, ont ensuite fait office de référence pour les essais de couplage réalisés en présence de porphyrine.

I.4.2. Réaction de Barton *et al.*

La réaction a été conduite sous flux d'azote. Après solubilisation du carbonate de sodium (4,4 éq.) dans l'eau à température ambiante, la solution a été refroidie à 0°C avant d'introduire la méthylphloroacétophénone. Le ferricyanure de potassium (1,5 éq.) solubilisé dans l'eau a ensuite été ajouté goutte à goutte. Après 30 minutes de réaction à froid et acidification du milieu par une solution d'acide sulfurique à 6 N, une extraction par l'éther diéthylique a été effectuée. La phase organique a ensuite été séchée par du sulfate de magnésium puis évaporée à sec pour obtenir le résidu, noté R1, qui a été analysé par CPG-SM (Figure 158).

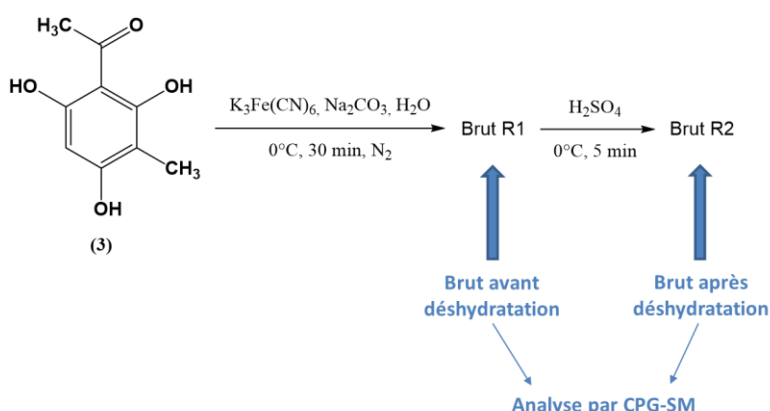


Figure 158 : Obtention des bruts R1 et R2 par la réaction de Barton *et al.* (1956).

Sur le résidu R1, l'étape de déshydratation de l'acide hydrousnique pour former l'acide usnique a été réalisée à 0°C en présence d'acide sulfurique concentré. Après extraction par le chloroforme et évaporation à sec, le brut réactionnel R2 a également été analysé par CPG-SM.

Les chromatogrammes obtenus pour les deux bruts R1 et R2 ont mis en évidence la présence d'acide hydrousnique (pic moléculaire à $m/z = 362$) et d'acide usnique (pic moléculaire à $m/z = 344$), à des temps de rétention respectifs d'environ 21 minutes et 24 minutes (Figure 159).

Alors que le brut R1 correspond au brut avant déshydratation, la présence d'acide usnique y a été détectée. Nous avons alors supposé qu'une partie de l'acide hydrosunique ait pu se déshydrater au moment de l'injection pour l'analyse, la température de l'injecteur étant de 250°C. Afin de vérifier cette hypothèse, l'échantillon a été analysé par CLHP-UVBD en phase inverse (colonne C18), dans les conditions utilisées tout au long de ce travail pour la détection d'acide usnique. Cette analyse a effectivement démontré l'absence d'acide usnique dans l'échantillon R1. La même analyse par CLHP-UVBD a également été réalisée sur le brut R2 (après déshydratation) et a permis de confirmer la présence d'acide usnique, avec un temps de rétention de 19,25 minutes (Figure 160).

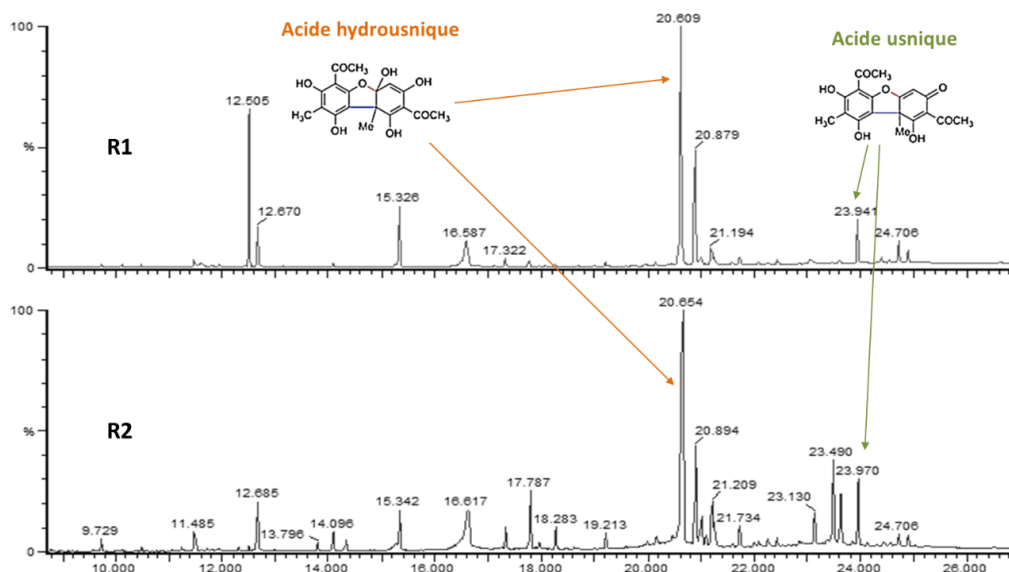


Figure 159 : Chromatogrammes obtenus, par analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, avant (R1) et après déshydratation (R2).

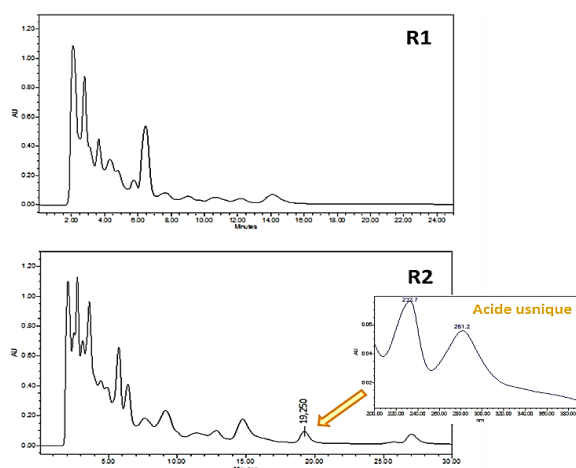


Figure 160 : Chromatogrammes (à 230 nm) des bruts R1 (avant déshydratation) et R2 (après déshydratation) obtenus par analyse CLHP-UVBD (phase inverse).

Le dosage par CLHP de l'acide usnique formé a également permis d'évaluer le rendement de réaction à environ 0,15 % soit un rendement deux fois inférieur à celui obtenu par Barton *et al.* (1956).

Le chromatogramme du brut R1 obtenu par analyse CPG-SM et présenté précédemment a ensuite été utilisé comme référence. Plusieurs essais ont été mis en œuvre en présence de la porphyrine sélectionnée afin d'obtenir l'acide hydrousnique, conduisant après déshydratation, à l'acide usnique. Un suivi par CPG-SM a été effectué pour repérer la formation d'acide hydrousnique lors de l'étape de couplage dont les conditions opératoires, en présence de porphyrine, sont décrites ci-après.

I.4.3. Essais de couplage en présence de la tétra(dichloro-phényl)porphyrine

Le catalyseur utilisé pour cette étude préliminaire est la tétra(dichloro-phényl)porphyrine commerciale. Les différentes conditions de couplage mises en œuvre dans le méthanol sont présentées dans le Tableau 19. Les bruts réactionnels obtenus ont été analysés par CPG-SM afin de détecter la présence d'acide hydrousnique.

Les premiers essais, notés 1 et 2, ont été effectués en se basant sur les travaux de Jiang *et al.* (2013). Bien que le mécanisme exact ne soit pas connu, les auteurs ont montré que le couplage oxydant carbone-carbone entre deux phénols est possible *via* l'utilisation d'une porphyrine métallée au cobalt en milieu basique. Les essais 1 et 2 ont donc été conduits en présence de dioxygène (oxydant), en milieu basique, à chaud ou à température ambiante, et avec ou sans irradiation lumineuse. Dans les deux cas, l'analyse par CPG-SM des bruts réactionnels n'a pas révélé la présence d'acide hydrousnique.

Tableau 19 : Conditions mises en oeuvre pour les premiers essais de couplage de la méthylphloroacétophénone.

Essais	Porphyrine	Base	H ₂ O ₂	Conditions	Détection acide hydrousnique	Référence
1	0,2 % M	1 éq. K ₂ CO ₃	-	Sous pression O ₂ (5 bar), 60°C, 16h	Non	Jiang <i>et al.</i> (2013)
2		1 éq. NaHCO ₃	-	Barbotage O ₂ , irr. lumineuse, TA, 17h	Non	
3	0,5 % M	-	1 éq.	120°C, 6h, 8 bars	Non	Šmejkalová et Piccolo (2005 et 2006)
4		-			Non	
5	10 % M	-		70°C, 3h	Oui	
6	20 % M	-			Oui	
7	10 % M	-		TA, 5h	Oui	

Les essais 1 et 2 n'ayant pas induit la formation d'acide hydrousnique, d'autres conditions opératoires, adaptées des travaux de Šmejkalová et Piccolo (2005 et 2006) ont ensuite été réalisés. Le peroxyde d'hydrogène a été utilisé comme agent oxydant et les réactions ont été menées à chaud ou à température ambiante. Pour les essais 3 et 4, effectués à chaud et en présence de 0,5 % molaire de catalyseur, l'acide hydrousnique n'a pas été détecté dans le milieu réactionnel. En revanche, les essais 5 et 6, pour lesquels la quantité de porphyrine a été multipliée respectivement par 20 et 40, ont conduit à la formation de l'acide hydrousnique souhaité. L'essai 7, effectué à température ambiante en présence de 10 % molaire de porphyrine a lui aussi permis la formation du composé attendu, ce qui

suppose que le chauffage n'est pas nécessaire pour induire le couplage de deux molécules de méthylphloroacétophénone.

Pour les essais 5 à 7, il est à noter que la proportion d'acide hydrousnique formée reste très faible ; sa quantification n'a donc pas pu être effectuée d'autant plus que les bruts réactionnels obtenus sont très complexes.

I.4.4. Discussion-conclusion

Au cours de cette étude préliminaire, des premiers essais de couplage entre deux molécules de méthylphloroacétophénone ont été effectués en présence d'une porphyrine octachlorée et métallée au fer. Les résultats obtenus mettent en évidence que, dans les conditions testées, la quantité de porphyrine mise en jeu a une incidence sur la formation de l'acide hydrousnique. D'autres essais pourraient ainsi être envisagés en utilisant des quantités plus importantes de catalyseur.

Si cette pré-étude montre la faisabilité d'un tel couplage et donnent des résultats encourageants, il conviendrait dans un travail ultérieur de redéfinir la structure de la porphyrine utilisée afin d'en optimiser le pouvoir catalytique.

A cet effet, le métal central de fer pourrait être remplacé par du manganèse ou encore du cobalt, autres métaux couramment retrouvés au niveau des centres porphyriniques naturels. Il serait également judicieux de tester l'efficacité de porphyrines de structures plus proches des complexes actifs protéine-hème des enzymes, telles que la peroxydase de raifort, afin d'en mimer l'activité. Il s'agirait de développer des porphyrines portant un groupement imidazole qui, *via* un bras espaceur suffisamment long, pourrait se recourber et ainsi complexer le métal central. Enfin, l'utilisation de catalyseurs supportés peut également être une piste de travail intéressante.

I.5. Bilan sur la synthèse de l'acide usnique

L'objectif principal de ce travail était d'optimiser la préparation du précurseur impliqué dans la synthèse de l'acide usnique : la méthylphloroacétophénone. Dans un premier temps, trois stratégies de synthèse de la méthylphloroacétophénone ont donc été explorées à partir du phloroglucinol et de la phloroacétophénone commerciaux. L'emploi de réactifs compatibles notamment avec une utilisation à l'échelle industrielle a été privilégié. L'utilisation de certains composés tels que le cyanure de zinc ou l'acide chlorhydrique gazeux a donc été proscrite.

La stratégie S1, effectuée en trois étapes, a conduit à un rendement convenable de 23,5 %. L'étape de formylation a notamment fait l'objet d'une purification plus simple et plus rapide à mettre en œuvre que celle présentée dans la littérature (Bharate *et al.*, 2006). La réduction du groupement aldéhyde est l'étape limitante de cette voie de synthèse avec un rendement moyen de 50 % alors que l'étape d'acétylation conduit à un rendement optimal de 70 %, conforme à la littérature.

La stratégie S2, qui consiste en une formylation de la phloroacétophénone suivie d'une réduction, a permis l'obtention de la méthylphloroacétophénone avec le rendement global le plus faible (9 %). Pour les deux étapes, des rendements nettement inférieurs à ceux obtenus dans le cas du phloroglucinol ont été observés. La présence d'un groupement acétyle sur le cycle semble donc induire une diminution de réactivité de la phloroacétophénone par rapport au phloroglucinol.

La stratégie S3, correspondant à une méthylation directe de la phloroacétophénone, est celle qui a conduit au meilleur rendement global (43 %). Les conditions opératoires ainsi que la méthode de purification mises en œuvre permettent une C-méthylation sélective de la méthylphloroacétophénone. Ainsi, la formation de coproduits O-méthylés n'a pas été observée contrairement au protocole de référence, facilitant ainsi la purification.

Bien que son coût soit en moyenne 5 fois plus élevé que celui du phloroglucinol, la stratégie S3 semble être la plus appropriée pour une potentielle utilisation à l'échelle industrielle. En effet, la méthylphloroacétophénone est obtenue avec un rendement acceptable en une seule étape et dans des conditions opératoires plutôt douces. De plus, la méthode de purification mise au point permet de récupérer le produit de départ n'ayant pas réagi ; celui-ci pourra ainsi être réengagé dans une nouvelle réaction. C'est donc cette méthode qui a été utilisée pour accumuler une masse de précurseur nécessaire pour effectuer les tests de couplage.

En amont des essais de couplage, la réaction de Barton *et al.* (1956), qui fait référence concernant la synthèse d'acide usnique, a été réalisée. L'analyse en CPG-SM des bruts réactionnels avant et après déshydratation a permis de déterminer les temps de rétention et les spectres de masse respectifs des acides hydrousnique et usnique formés. Les chromatogrammes obtenus ont ensuite été utilisés comme témoins pour les tests de couplage réalisés en présence de porphyrine.

Les essais de couplage mis en œuvre au cours de cette pré-étude ont montré qu'une porphyrine octachlorée métallée au fer est capable d'induire la formation de l'acide hydrousnique attendu. Si le nombre de coproduits observés est important et la quantité d'acide hydrousnique détectée trop faible pour estimer un rendement de réaction, ces premiers résultats restent néanmoins prometteurs et ouvrent la voie à de nouvelles perspectives quant à l'utilisation de macrocycles tétrapyrroliques comme catalyseurs biomimétiques.

Il conviendrait dans une prochaine étude d'optimiser les conditions de couplage et en particulier d'étudier des porphyrines de structures voisines de celles des noyaux pyrroliques des enzymes. D'autres métaux pourront être utilisés à la place du fer (tels que le manganèse ou le cobalt) ; de plus, le greffage d'un bras espaceur portant une fonction imidazole permettrait d'améliorer le pouvoir catalytique de la porphyrine utilisée (Figure 161).

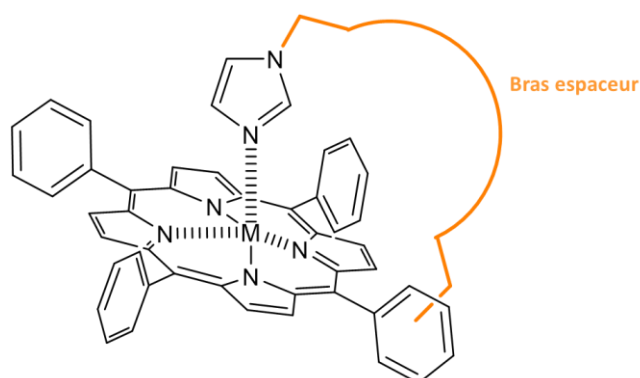


Figure 161 : Modifications structurales envisagées pour la porphyrine octachlorée.

M = métal central (fer, manganèse ou cobalt).

Une deuxième approche synthétique a été menée pour une xanthone nouvelle et originale, la cladoxanthone A, identifiée lors de l'étude phytochimique du lichen *Cladonia incrassata* (Figure 162).

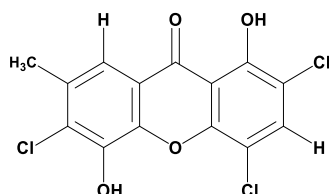


Figure 162 : Structure de la cladoxanthone A, isolée du lichen *C. incrassata*.

La cladoxanthone A possède une structure singulière : d'une part, la position du groupement méthyle est atypique par rapport aux xanthones classiquement décrites, et d'autre part, il s'agit d'une xanthone trichlorée polysubstituée. Le travail a consisté ici à effectuer une étude préliminaire quant à la synthèse de cette molécule, l'objectif étant d'ouvrir la voie à des projets futurs concernant ce composé. En effet, sa synthèse en quantité suffisante permettrait d'une part d'en valider l'identification structurale, et d'autre part, d'effectuer des tests d'activité biologique (antimicrobiens, antioxydants...). Aussi, il est à noter que la synthèse de xanthones polychlorées reste complexe et très peu documentée (Fitzpatrick *et al.*, 1980 ; Elix et Bennett, 1990 ; Elix et Portelli, 1990 ; Elix *et al.*, 1992 ; Elix *et al.*, 1993 ; Portela *et al.*, 2007).

II. SYNTHÈSE DE LA CLADOXANTHONE A

Afin d'utiliser les xanthones et leurs dérivés à large échelle, plusieurs méthodes de synthèse ont été développées et sont proposées dans la littérature. Parmi elles, des méthodes dites classiques sont retrouvées et sont évoquées ci-après.

II.1. Synthèse de xanthones : rappels bibliographiques

Trois méthodes sont couramment utilisées pour la synthèse de xanthones : la réaction de Grover, Shah et Shah (GSS), la synthèse *via* des intermédiaires benzophénones, et la synthèse *via* des intermédiaires diaryléthers.

II.1.1. Réaction de Grover, Shah et Shah (GSS)

Une des premières méthodes de synthèse des xanthones a été introduite par Michael à la fin du 19^{ème} siècle (Michael, 1883). Elle implique la distillation d'un mélange d'un polyphénol et d'acide salicylique en présence d'un agent déshydratant (anhydride acétique ou chlorure de zinc) et permet

d'obtenir des hydroxyxanthones avec un faible rendement. Cette approche a donc été améliorée en 1955 par Grover, Shah et Shah avec une méthode nécessitant la présence d'un dérivé d'acide salicylique (**1**) et un polyphénol tel que le phloroglucinol (**2**), chauffés en présence de chlorure de zinc dans le trichlorure de phosphore (Grover *et al.*, 1955). Cependant, cette méthode conduit au squelette xanthone (**4**) uniquement si l'intermédiaire benzophénone (**3**) porte un hydroxyle dans une position permettant la cyclisation (notée *) (Figure 163).

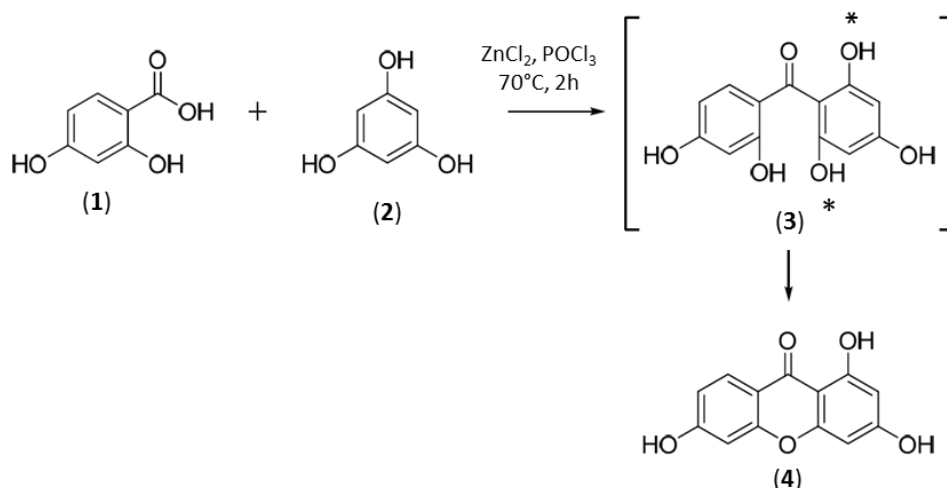


Figure 163 : Synthèse de xanthones selon la méthode de Grover, Shah et Shah (GSS) (1955).

Des modifications récentes de cette méthode ont été réalisées par l'utilisation du réactif d'Eaton (pentaoxyde de phosphore et acide méthanesulfonique : P_2O_5/CH_3SO_3H) en tant qu'agent de couplage (Moreau *et al.*, 2002 ; Zou *et al.*, 2012). Ce réactif permet par exemple la condensation entre l'acide 2-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (**1**) et le phloroglucinol (**2**), et conduit à un rendement élevé (90 %) de la xanthone attendue (**3**) (Dai *et al.*, 2013) (Figure 164).

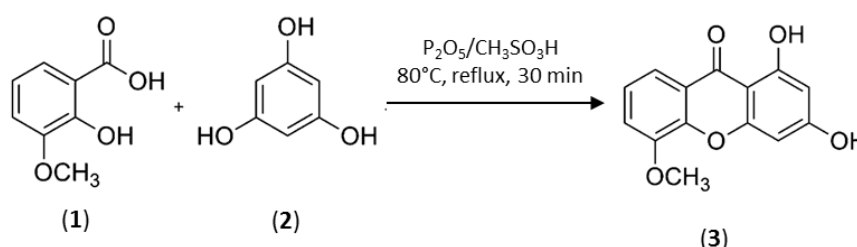


Figure 164 : Synthèse d'une xanthone en présence du réactif d'Eaton.

Si la méthode GSS permet d'obtenir des xanthones en « one pot », elle nécessite néanmoins la présence d'un groupement phénolique pour permettre la cyclisation directe de l'intermédiaire benzophénone en noyau xanthone. D'autres méthodes ont donc été développées et font intervenir la

formation d'intermédiaires benzophénones ou diaryléthers (ces deux derniers pouvant être obtenus par réarrangement d'un diarylester) (Mengwasser, 2011) (Figure 165).

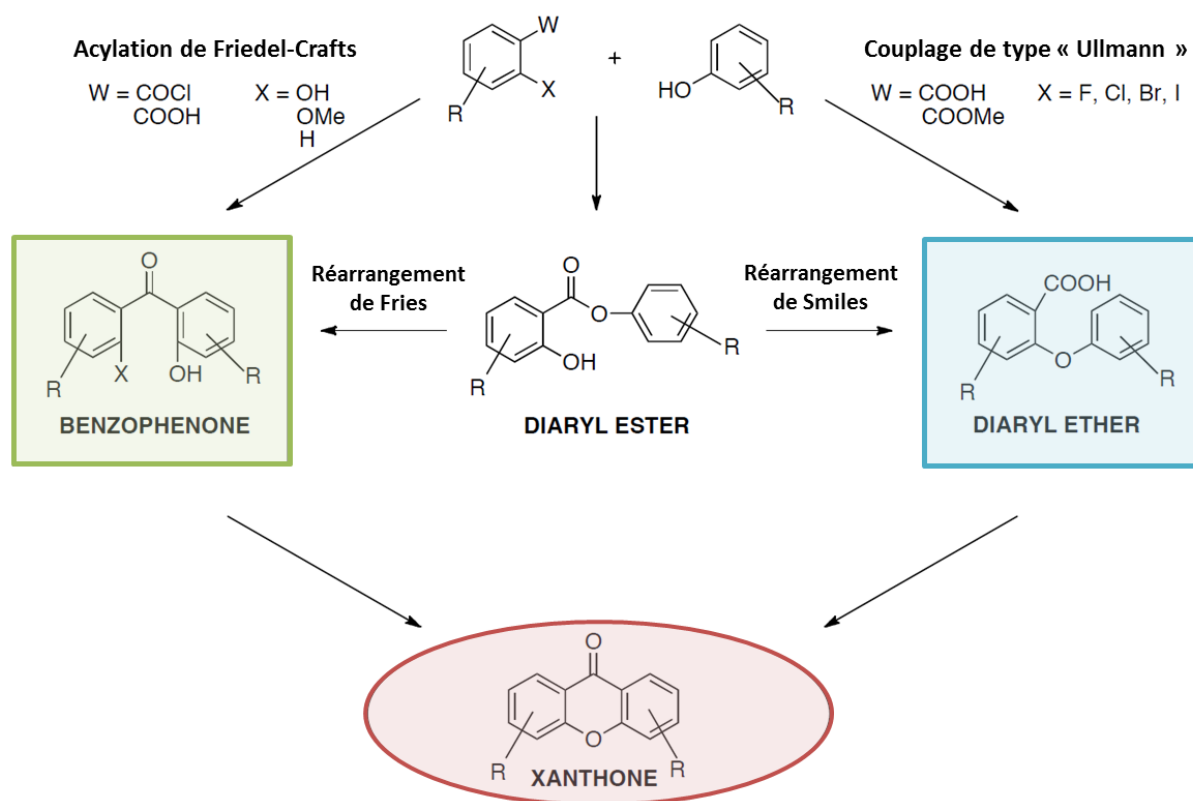


Figure 165 : Synthèse des xanthones *via* des intermédiaires benzophénone et diaryléther (adapté de Mengwasser, 2011).

II.1.2. Synthèse *via* un intermédiaire benzophénone

Quillinan et Scheinmann ont mis au point une alternative à la méthode GSS permettant la formation de 2-hydroxy-2'-méthoxybenzophénones, suivie d'une élimination du méthanol en présence d'une base pour donner les mono-, di-, tri-, tétra- et pentahydroxyxanthones attendues (Quillinan et Scheinmann, 1973). La synthèse est effectuée à température ambiante par une acétylation de Friedel-Crafts entre un dérivé méthoxybenzène (**1**) et un chlorure de benzoyle substitué (**2**). Dans les cas où l'acétylation est adjacente à un groupement méthoxy, une monodéméthylation sélective a lieu en position *ortho* du groupement carbonyle, en présence de trichlorure d'aluminium. La cyclisation de la benzophénone ainsi formée (**3**) conduit à la xanthone attendue (**4**) par élimination du méthanol (Figure 166).

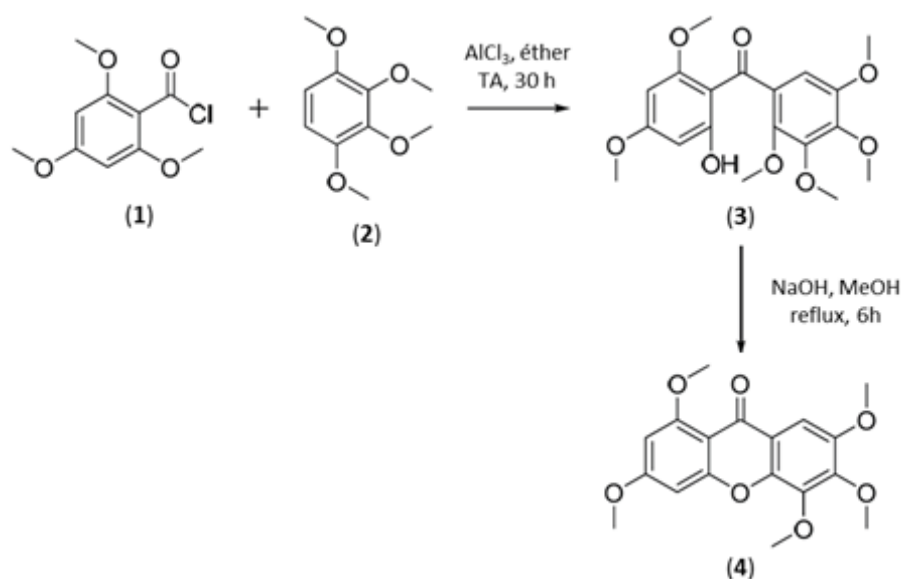


Figure 166 : Synthèse de xanthenes par acétylation de Friedel-Crafts en présence de trichlorure d'aluminium.

L'acétylation de Friedel-Crafts peut également être effectuée en présence d'anhydride trifluoroacétique (TFAA), suivie d'une déméthylation et d'une cyclisation pour former la xanthone souhaitée. C'est le cas de la synthèse d'une xanthone lichénique (5) pour laquelle la déméthylation est induite par le tribromure de bore et la cyclisation de la benzophénone obtenue (4) est réalisée par chauffage et sous pression dans l'eau (Elix *et al.*, 1993) (Figure 167).

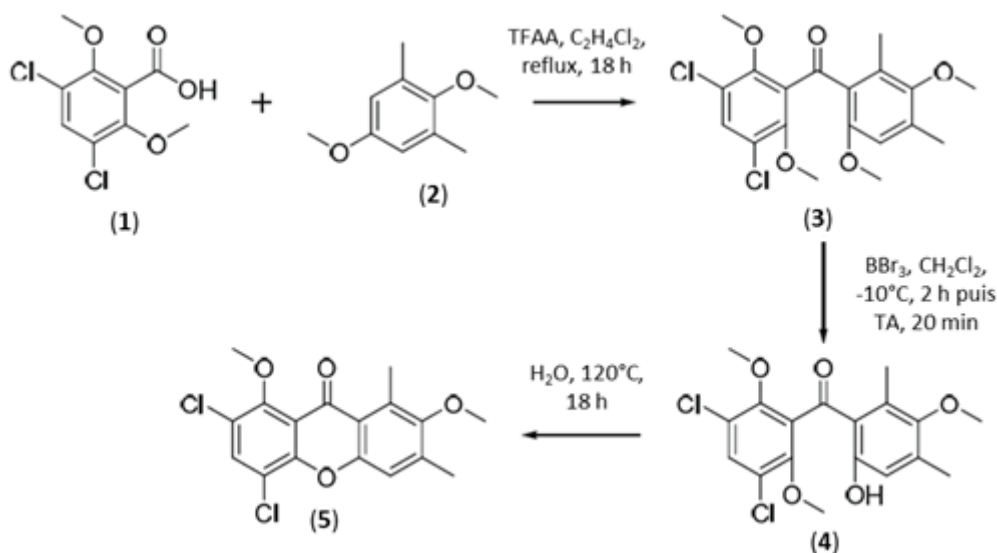


Figure 167 : Synthèse de xanthenes par acétylation de Friedel-Crafts en présence d'anhydride trifluoroacétique.

Une autre méthode pour accéder à l'intermédiaire benzophénone est le photo-réarrangement de Fries de diarylestere. Finnegan et Merkel ont développé une méthodologie permettant la formation

de la 2,5-dihydroxyxanthone par l'intermédiaire d'une réaction de Fries (Finnegan et Merkel, 1972). Dans un premier temps, la condensation de l'acide 2,3-diméthoxybenzoïque sur le 1-hydroxy-4-méthoxybenzène conduit à la formation d'un diarylester (1). Ce dernier est transformé en benzophénone (2) par photo-réarrangement de Fries, suivi d'une déméthylation par le bromure d'hydrogène, puis d'une cyclisation à chaud dans l'eau et sous pression, pour former la xanthone souhaitée (3) (Figure 168).

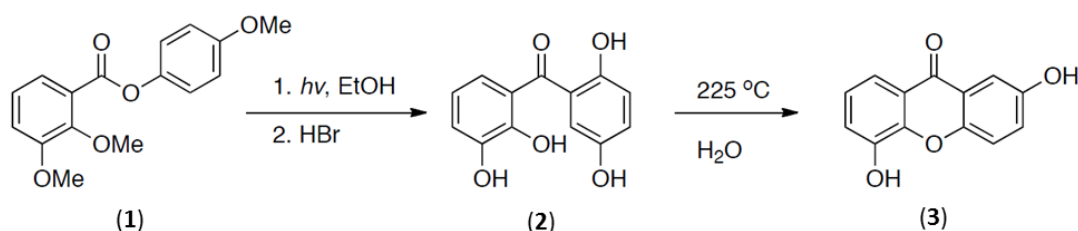


Figure 168 : Formation de benzophénones par photo-réarrangement de Fries.

II.1.3. Synthèse *via* un intermédiaire diaryléther

La synthèse de xanthes via des diaryléthers utilise des réactions entre des phénols et des acides benzoïques portant un halogène en position *ortho*, la formation du cycle s'effectuant par une cycloacétylation électrophile de l'acide 2-aryloxybenzoïque formé. La première synthèse totale d'une xanthone d'origine naturelle, l'euxanthone (1,7-dihydroxyxanthone) utilise cette méthode (Ullmann et Panchaud, 1906) (Figure 169).

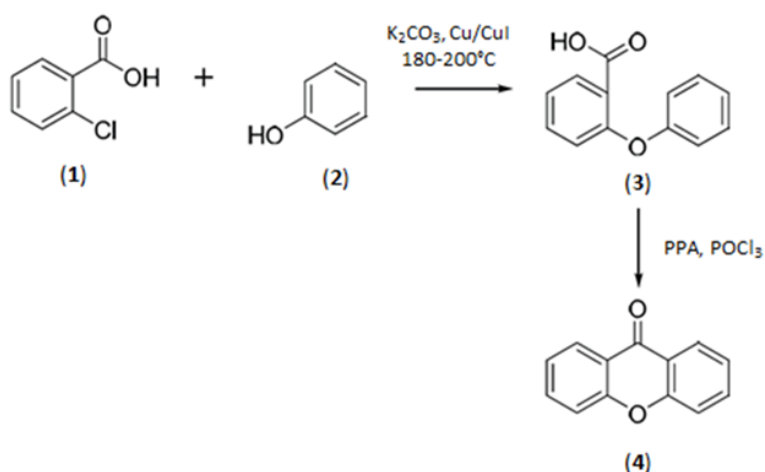


Figure 169 : Synthèse de l'euxanthone par Ullmann et Panchaud (1906).

Elle repose sur la condensation d'un phénol (**2**) et d'un acide *ortho*-chlorobenzoïque (**1**) en présence de carbonate de potassium et de cuivre comme catalyseur. L'acide 2-phénoxybenzoïque est ensuite traité avec de l'acide polyphosphorique (PPA) et du trichlorure de phosphore (POCl_3) pour former la xanthone (**3**).

Afin de synthétiser une xanthone d'origine lichénique, Elix *et al.* ont obtenu l'intermédiaire diaryléther via un réarrangement de Smiles d'un diarylester (*Elix et al.*, 1993) (Figure 170).

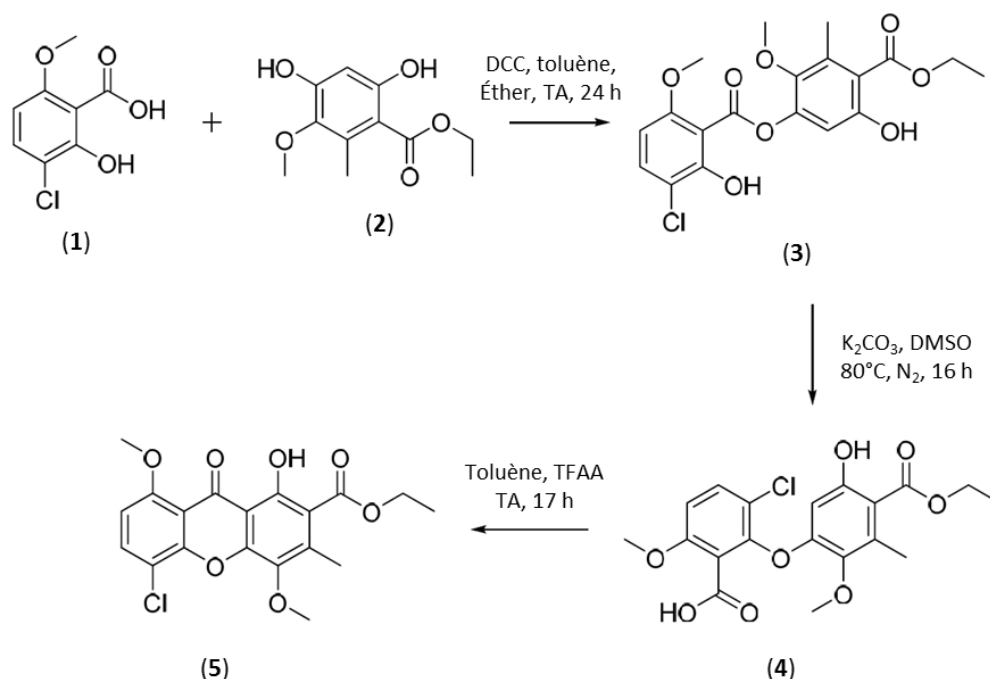


Figure 170 : Formation de l'intermédiaire diaryléther par réarrangement de Smiles d'un diarylester.

La formation de l'ester (**3**) est effectuée par condensation d'un acide benzoïque (**1**) et d'un phénol (**2**) en présence de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Le traitement par du carbonate de potassium permet ensuite le réarrangement de Smiles en diaryléther (**4**), dont le traitement par l'anhydride trifluoroacétique induit la cyclisation en xanthone (**5**).

Dans la littérature, un grand nombre d'articles traitant de la modification du noyau xanthone afin d'introduire des groupements fonctionnels de natures variées sont également retrouvés ; ils ne seront cependant pas présentés ici.

Sur la base de cet état de l'art, différentes stratégies de synthèse ont été envisagées pour la cladoxanthone A et sont décrites ci-après.

II.2. Stratégie de synthèse

Comme cela a été décrit précédemment, la synthèse des xanthones en général peut être effectuée soit par couplage de cycles polysubstitués soit par incorporation de groupements fonctionnels directement sur le noyau xanthone. Ainsi, deux approches sont envisageables concernant la synthèse de la cladoxanthone A (Figure 171) :

- Fonctionnalisation d'un noyau xanthone peu ou pas substitué ;
- Préparation puis couplage des deux précurseurs aromatiques polysubstitués.

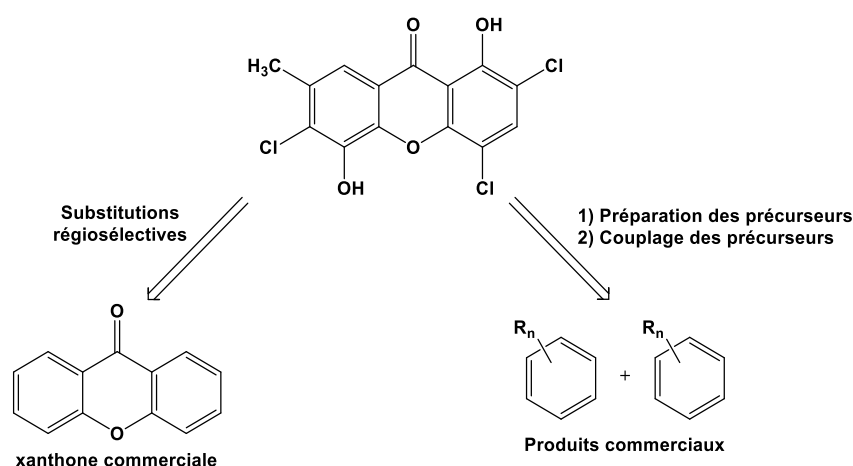


Figure 171 : Possibilités d'obtention de la cladoxanthone A.

Afin de valider l'identification structurale de la cladoxanthone A, la seconde possibilité impliquant le couplage des deux précurseurs apparaissait plus adaptée et plus simple à mettre en œuvre ; elle a donc été sélectionnée pour démarrer le travail de synthèse.

Dans un second temps, l'analyse rétrosynthétique de la cladoxanthone A a permis de définir les deux stratégies de synthèse présentées sur la Figure 172, toutes deux basées sur le couplage de deux noyaux aromatiques polysubstitués notés A et B. Celles-ci ont été choisies en particulier car elles font intervenir en tant que précurseur A un composé commercial peu coûteux : le 4,6-dichlororésorcinol. Le second précurseur devrait être obtenu par modifications chimiques de composés commerciaux, sélectionnés en fonction de leurs substituants.

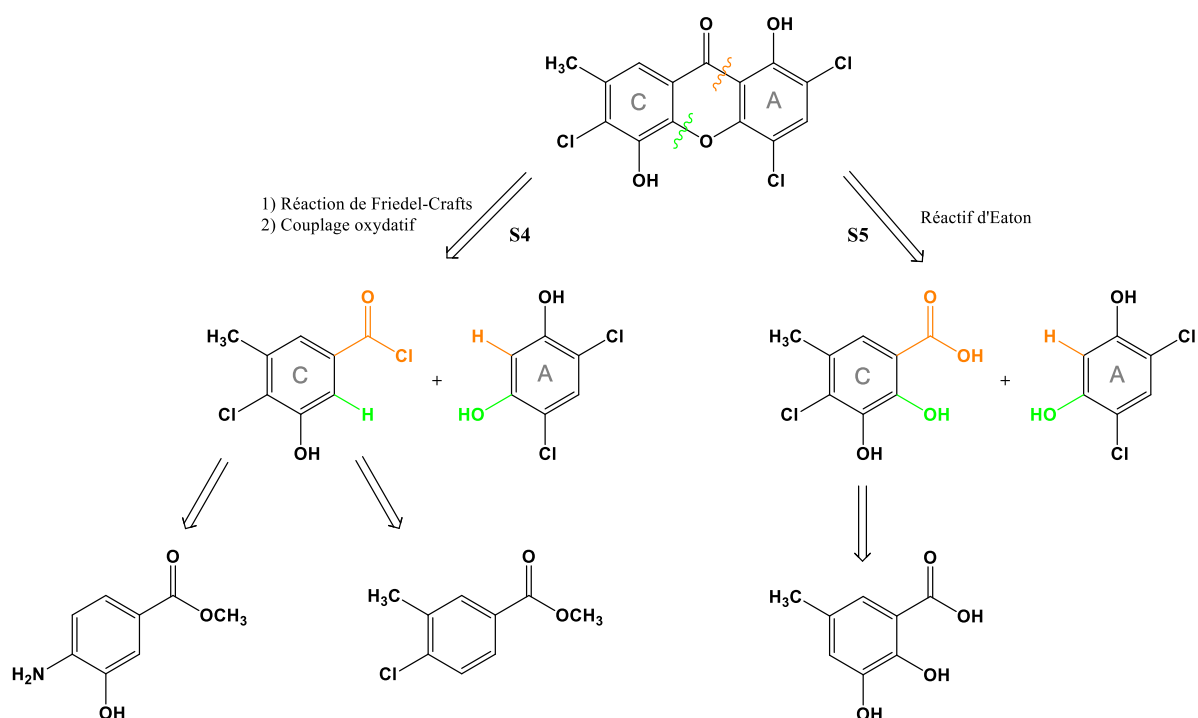


Figure 172 : Schéma rétrosynthétique de la cladoxanthone A.

Afin de préparer la cladoxanthone A, une réaction de type Friedel-Crafts suivie d'un couplage oxydatif ont été envisagés dans le cas de la stratégie S4, tandis que le réactif d'Eaton, permettant d'effectuer le couplage en une seule étape, pourra être utilisé dans le cas de la stratégie S5.

II.3. Stratégie S4

Concernant cette stratégie, le couplage entre les deux précurseurs A et C a été envisagé en deux étapes : un couplage par l'intermédiaire d'une réaction de Friedel-Crafts entre le chlorure d'acyle du noyau C et le noyau A puis, dans un second temps, un couplage oxydatif *via* l'utilisation de systèmes catalytiques pour former la liaison éther aryle formant ainsi la cladoxanthone A.

Afin de synthétiser le noyau C, une première molécule de départ commerciale a été sélectionnée : le 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle.

II.3.1. Synthèse à partir du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle

La stratégie de synthèse adoptée pour la préparation du noyau C est représentée sur la Figure 173. L'introduction du groupement chlore en position 4 est envisagée par réaction de Sandmeyer à partir d'un sel de diazonium préalablement obtenu par diazotation du groupement amino. Le méthyle

est quant à lui obtenu en position 5 par réduction d'un groupement formyle introduit selon la méthode de Vilsmeier-Haack.

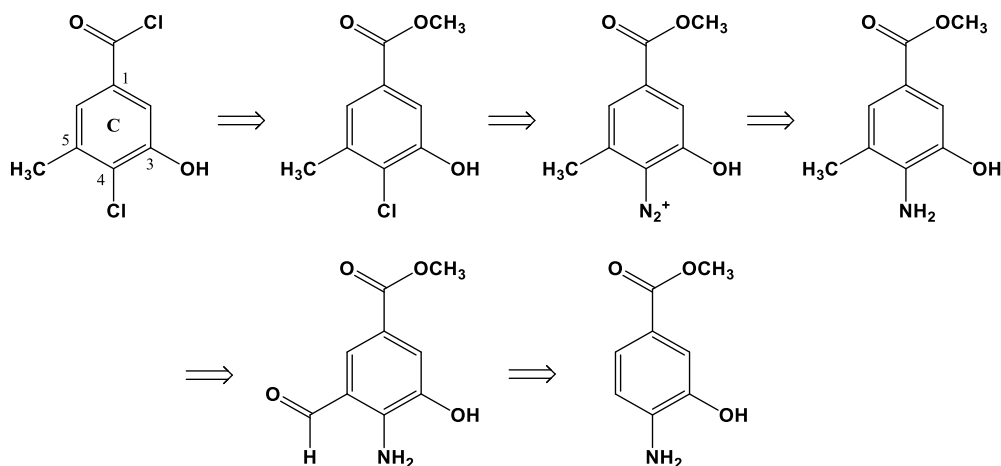


Figure 173 : Stratégie de synthèse du noyau C à partir du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle.

Voyons à présent en détail la première étape correspondant à la réaction de formylation du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle.

II.3.1.1. Méthode « classique » de formylation

Un premier essai de formylation de type Vilsmeier-Haack a été effectué en présence de trichlorure de phosphore et de diméthylformamide anhydre dans l'acétate d'éthyle, à température ambiante (Figure 174).

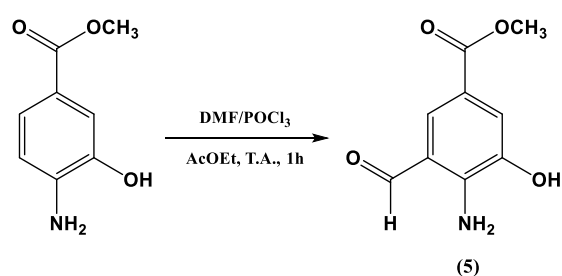


Figure 174 : Formylation du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle.

Tout d'abord, le diméthylformamide (1 éq.) et le trichlorure de phosphore (1 éq.) ont été mis à réagir pour former un premier intermédiaire iminium chloré. Celui-ci a ensuite été ajouté goutte à goutte à 200 mg de 4-amino-3-benzoate de méthyle solubilisé dans l'acétate d'éthyle, pour donner un second intermédiaire iminium. La formation d'un précipité a été remarquée presque instantanément lors de l'ajout.

Après une heure de réaction à température ambiante, la disparition totale du composé de départ a été observée par CCM ; la filtration du précipité suivie d'une recristallisation dans l'eau, permettant l'hydrolyse de l'intermédiaire iminium, a conduit à l'obtention de 148 mg d'un composé dont l'analyse détaillée par spectrométrie de masse haute résolution et RMN (^1H , ^{13}C , HMBC et HMQC) a permis de déterminer qu'il ne s'agissait pas de celui attendu (Tableau 20 et Figure 175).

Tableau 20 : Déplacements chimiques obtenus par analyse RMN 1H (400 MHz) et 13C (100 MHz) du composé formé par formylation du 4-amino-3-benzoate de méthyle (dans DMSO-d6).

no.	^1H	^{13}C
1		124,5 C
2	7,47 d, $J = 1,8$ Hz	115,0 CH
3		146,1 C
4		130,7 C
5	8,27 d, $J = 8,4$ Hz	119,4 CH
6	7,43 dd, $J = 1,8$ et $8,4$ Hz	120,8 CH
7		165,9 C
8		51,9 OCH_3
9	9,83 s	
10	8,36 s	160,5 C
OH-3	10,46 br s	

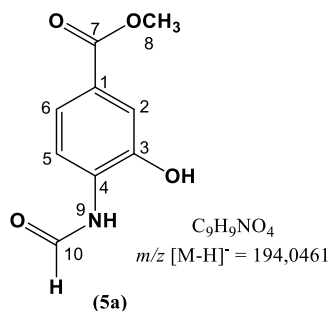


Figure 175 : Composé obtenu par la réaction de Vilsmeier-Haack sur le 4-amino-3-benzoate de méthyle.

La fonction aldéhyde a été greffée sur l'amine primaire, qui semble donc être plus réactive que la position souhaitée. Bien qu'en théorie les effets électroniques des substituants du cycle devraient contribuer au bon déroulement de la réaction, cet essai n'a pas été concluant et n'a pas permis d'obtenir le composé formylé attendu.

Deux autres essais de formylation, utilisant des conditions opératoires différentes, ont ensuite été effectués en se basant sur les travaux de Kiran et Mahadevan (2006). En effet, ces auteurs ont déjà

observé ce type de réactivité sur des dérivés aminobenzène et ont proposé une méthode induisant la formylation de l'amine et du cycle, suivie d'une coupure sélective de la liaison formamide. Cette méthode a donc été appliquée au 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle (Figure 176).

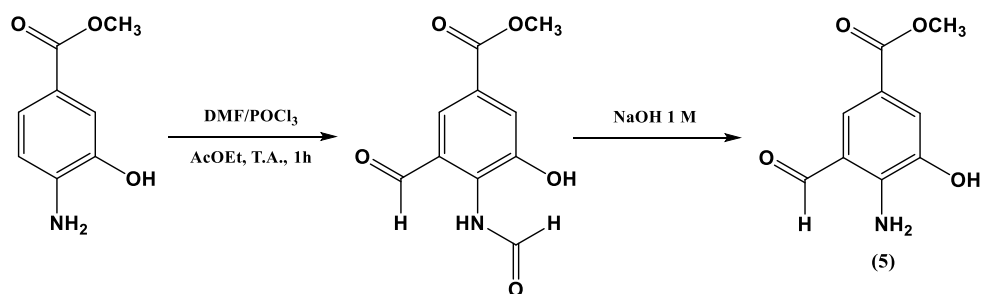


Figure 176 : Formylation du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle par la méthode de Kiran et Mahadevan (2006).

II.3.1.2. Méthode de formylation adaptée de Kiran et Mahadevan (2006)

Après formation du premier intermédiaire iminium en présence de 8 équivalents de POCl_3 et 8 équivalents de DMF sous argon pendant 15 minutes à froid, celui-ci a été ajouté goutte à goutte au 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle solubilisé dans le DMF. La réaction a ensuite été conduite pendant 30 minutes à froid, puis 30 minutes à température ambiante, pour terminer par un chauffage à 80°C pendant 2 heures. Enfin, l'hydrolyse de l'intermédiaire iminium formé a été effectuée en présence d'une solution de soude 1 M (4 éq.) à reflux pendant 1 heure.

Dans tous les cas, l'analyse du brut réactionnel par chromatographie sur couche mince a mis en évidence la présence de plusieurs composés. Etant donné la complexité des bruts réactionnels, les résultats obtenus par RMN ^1H et ^{13}C sont donc difficilement exploitables.

Les essais de formylation effectués sur le 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle ne se sont pas montrés concluants ; en effet, il semble difficile d'introduire sur ce composé la fonction aldéhyde et donc un groupement méthyle. Ainsi, une autre stratégie de synthèse du noyau C a été envisagée. Un nouveau composé commercial portant un méthyle sur la position souhaitée a donc été sélectionné : le 4-chloro-3-méthylbenzoate de méthyle.

II.3.2. Synthèse à partir du 4-chloro-3-méthylbenzoate de méthyle

Le but était ici de greffer un hydroxyle en position 5 en passant par une étape de nitration suivie d'une réduction pour former l'amine correspondante. Une étape de diazotation-hydroxylation permettrait ensuite d'obtenir la fonction hydroxyle. Enfin, le chlorure d'acide pourra être obtenu par une séquence de déprotection-chloration de l'ester de méthyle (Figure 177).

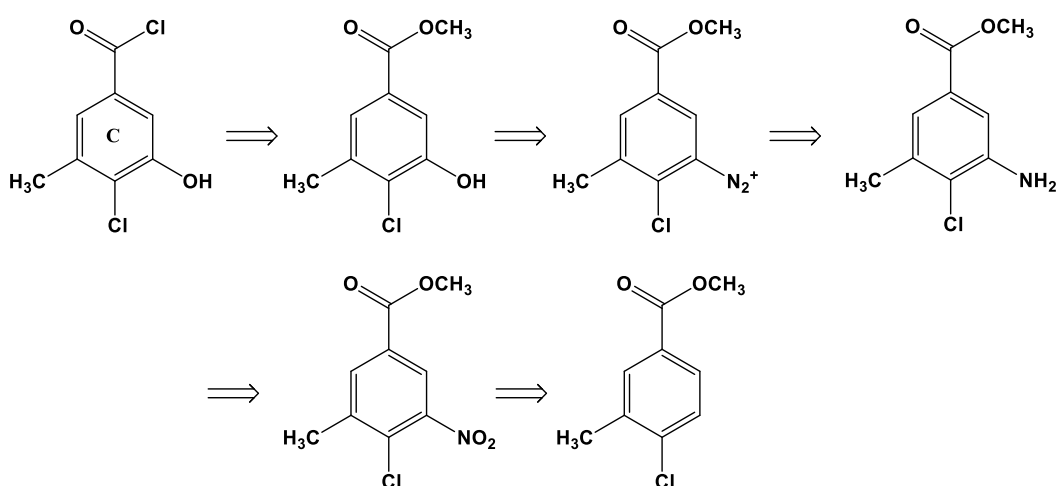


Figure 177 : Schéma rétrosynthétique du noyau C à partir du 4-chloro-3-méthylbenzoate de méthyle.

II.3.2.1. Nitration

La première étape effectuée en vue d'obtenir le noyau C à partir du 4-chloro-3-méthylbenzoate de méthyle est sa nitration en position 5 (Figure 178). A cet effet, la formation de l'ion nitronium NO_2^+ a été mise en œuvre dans le but d'effectuer une substitution électrophile sur le cycle (Burgess, 1997).

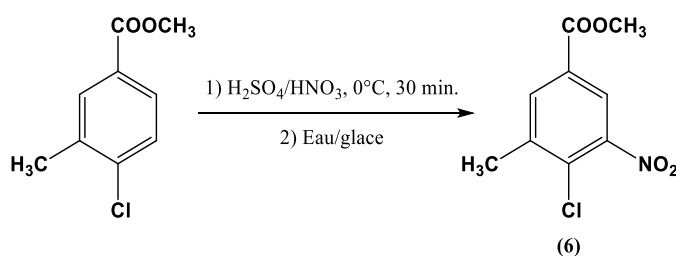


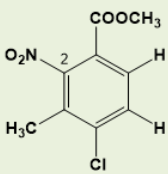
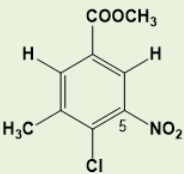
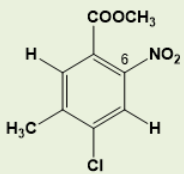
Figure 178 : Nitration du 4-chloro-3-méthyl benzoate de méthyle.

Les acides sulfurique et nitrique (3,7 et 4,2 équivalents respectivement) ont été mélangés à 0°C pour former l'électrophile ; ce dernier a ensuite été ajouté goutte à goutte au produit de départ solubilisé dans l'acide sulfurique. Le milieu réactionnel a été maintenu à 0°C pendant 30 minutes avant d'être versé sur 50 mL d'un mélange eau-glacé.

Après extraction par l'acétate d'éthyle, neutralisation par l'hydrogénocarbonate de sodium et séchage par le sulfate de magnésium, l'évaporation du filtrat conduit à une huile jaune.

Bien que son analyse par CCM ait révélé la présence d'un seul spot, les résultats obtenus par RMN ^1H ont mis en évidence trois régioisomères, nitrés en position 2, 5 et 6, le composé majoritaire étant celui attendu (nitré en position 5). Le Tableau 21 présente les structures des trois composés ainsi que leurs déplacements chimiques respectifs.

Tableau 21 : Données RMN, structure et proportion estimée des trois composés nitrés.

Hydrogènes aromatiques (ppm)	7,85 ; d, 1H 7,57 ; d, 1H	8,24 ; d, 1H 8,12 ; d, 1H	7,92 ; s, 1H 7,60 ; s, 1H
Constantes de couplage J (Hz)	8,5 (ortho)	1,4-1,8 (meta)	/ (para)
O-CH₃ (ppm)	3,90	3,96	3,92
CH₃ (ppm)	2,35	2,54	2,48
Structure			
Proportions estimées (%)	15	50	35

Malgré les diverses possibilités de substitution, la première étape mise en œuvre a donc abouti à la formation du composé souhaité, présent à hauteur de 50 % en mélange avec les deux autres régioisomères. Cependant, les trois composés ne se distinguent pas par leur migration en CCM phase normale et ce quel que soit l'éluant utilisé. C'est pourquoi la purification a été envisagée sur colonne de silice C18 (phase inverse apolaire). Des essais préalables par CLHP analytique ont permis de déterminer des conditions adaptées à la séparation délicate de ces composés en phase inverse.

Le mélange de régioisomères a ensuite été purifié par chromatographie éclair en phase inverse qui a permis de récupérer le 4-chloro-3-méthyl-5-nitrobenzoate de méthyle (**6**), sous forme d'un solide blanc d'aspect fibreux, avec un rendement de 40 %. Afin de caractériser le régioisomère isolé, une analyse RMN ^1H a été effectuée et a mis en évidence une constante de couplage *meta* entre les deux hydrogène aromatiques. Enfin, une analyse par SMHR a confirmé sa formule chimique, $\text{C}_9\text{H}_8\text{ClNO}_4$ (m/z $[\text{M}-\text{H}]^+ = 230,0216$).

Une fois le composé nitré obtenu, la seconde étape de la stratégie de synthèse a été mise en œuvre ; il s'agit de sa réduction permettant la formation du composé aminé correspondant.

II.3.2.2. Réduction

Une hydrogénation a ensuite été effectuée sur le composé nitré afin de réduire la fonction nitro en fonction amine (Figure 179).

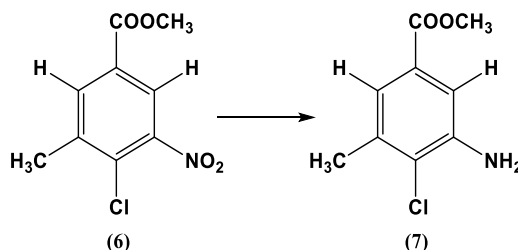


Figure 179 : Réduction du 4-chloro-3-méthyl-5-nitrobenzoate de méthyle.

Deux méthodes ont été mises en œuvre afin de déterminer celle qui serait la plus appropriée pour accumuler ce nouvel intermédiaire de synthèse.

II.3.2.2.a. Hydrogénation catalysée par le palladium sur charbon en présence de dihydrogène (Pd/C - H₂)

L'utilisation de dihydrogène gazeux (H₂), pour parvenir à l'hydrogénation de composés organiques, est classique. De plus, les métaux du groupe du platine, comme le palladium (dispersé sur un support : Pd/C), sont des catalyseurs particulièrement actifs qui agissent à basse température et faible pression de H₂ (Brieger et Nestricks, 1974).

Le composé nitré a été solubilisé dans le méthanol en présence de 5 % (m/v) de palladium sur charbon et la réduction a été conduite à température ambiante sous flux de dihydrogène. Après 10 heures de réaction, l'élimination du palladium, catalyseur hétérogène de la réaction, a été effectuée par simple filtration sur fritté. Après évaporation sous pression réduite du filtrat, la reprise par l'acétate d'éthyle a conduit à la précipitation d'une partie du brut.

Le filtrat obtenu a été purifié par chromatographie circulaire centrifuge pour permettre l'obtention du composé aminé d'intérêt avec un rendement de 42 %. L'analyse RMN ¹H de ce dernier a notamment mis en évidence une constante de couplage *meta* entre les hydrogènes à 7,37 et 7,20 ppm. Les déplacements chimiques obtenus sont présentés dans le Tableau 22. La réduction de la fonction nitro en fonction amine a également été confirmée par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif avec la formule brute suivante : C₉H₁₀ClNO₂ (*m/z* [M-H]⁺ = 200,0478).

Tableau 22 : Données RMN ^1H du composé aminé attendu.

Hydrogènes aromatiques (ppm)	7,37 ; d, 1H 7,20 ; d, 1H
Constantes de couplage J (Hz)	1,7-1,2 (<i>meta</i>)
O-CH ₃ (ppm)	3,83
CH ₃ (ppm)	2,35
NH ₂ (ppm)	5,16

Le 3-amino-4-chloro-5-méthylbenzoate de méthyle attendu (**7**) a donc été obtenu avec un rendement moyen de 42 %. Le précipité formé par ajout d'acétate d'éthyle correspond à un unique composé dont le rendement s'élève à 31 %. L'analyse structurale par spectrométrie de masse haute résolution de ce dernier a fourni une masse m/z $[\text{M-H}]^+ = 165,0864$ correspondant à la formule brute suivante : $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}_2$. Ce composé ne possède donc plus l'halogène ; ceci a été confirmé par analyse RMN ^1H avec la présence de trois protons aromatiques à 7,69 ; 7,67 et 7,36 ppm au lieu de deux pour le produit chloré. Le co-produit correspond donc au produit aminé sans le chlore présent initialement en position 4 : le 3-amino-5-méthylbenzoate de méthyle (Figure 180).

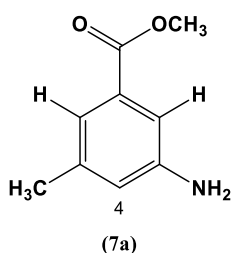


Figure 180 : Structure du co-produit obtenu lors de la réduction par le palladium sur charbon en présence de dihydrogène.

Dans la littérature, la coupure de la liaison carbone-chlore est reportée pour des conditions classiques d'hydrogénation catalysée par le Pd/C de chloronitrobenzènes. Dans le cas des *para*- (Mallat et Baiker, 2000 ; Chen et Lee, 2013) et des *meta*-chloronitrobenzènes (Chen *et al.*, 2008), le coproduit aminé après perte du chlore est formé à hauteur de 7 à 8 %. Dans le cas des *ortho*-chloronitrobenzènes, ce même coproduit peut représenter jusqu'à 50 % du brut réactionnel (Su *et al.*, 2013) ; le rendement de 31 % obtenu dans notre cas est donc conforme à la littérature.

Cette méthode a donc permis d'obtenir le composé attendu, le 3-amino-4-chloro-5-méthylbenzoate de méthyle, avec un rendement de 42 %, mais un co-produit a également été formé à hauteur de 31 %. De ce fait, un autre protocole a été mis en œuvre afin d'améliorer le rendement en produit aminé.

II.3.2.2.b. Hydrogénation par le chlorure d'étain (SnCl_2)

De nombreuses techniques d'hydrogénation utilisant d'autres sources de H_2 ont été développées. Parmi elles, l'emploi du chlorure d'étain, en milieu acide ou non, permet une réaction d'hydrogénation, l'oxydation de l'étain fournissant les électrons nécessaires à la réduction.

Un premier essai a été mené en milieu acide (Chen *et al.*, 2008). Après solubilisation du chlorure d'étain anhydre (3,96 équ.) dans un mélange acide chlorhydrique/éthanol à reflux (70°C), le composé nitré a été ajouté en plusieurs fois (pendant 30 minutes). Après 24 heures à reflux, la réaction a été stoppée par ajout d'eau ; le brut réactionnel a ensuite été évaporé à sec puis purifié par chromatographie centrifuge circulaire pour obtenir le composé aminé attendu avec un rendement moyen de 40 %. D'autres essais auraient pu être effectués afin d'optimiser cette méthode mais la présence de nombreux sels en fin de réaction a été observée et rend la purification difficile. Une autre méthode de réduction n'utilisant pas d'acide a donc été envisagée pour la suite du travail.

La réduction est par la suite mise en œuvre sans acide (Bellamy et Ou, 1984). Après solubilisation du produit nitré dans l'éthanol absolu, 5 équivalents de chlorure d'étain anhydre ont été ajoutés. La réaction a été conduite à reflux (70°C) pendant 30 minutes sous flux d'argon. Après ajout de glace, le milieu réactionnel est neutralisé par une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis extrait par l'acétate d'éthyle. Une fois la phase organique évaporée à sec, la purification sur plaques préparatives a permis l'obtention du composé attendu avec un rendement de 65 %.

Cette méthode a donc été sélectionnée afin d'accumuler le composé aminé pour l'étape suivante qui vise à remplacer la fonction amine par un groupement hydroxyle *via* une réaction de diazotation.

II.3.2.3. Diazotation - hydroxylation

Avec pour objectif sa conversion en groupement hydroxyle, la fonction amine du 3-amino-4-chloro-5-méthylbenzoate de méthyle a été préalablement transformée en sel de diazonium par réaction avec l'ion nitrosonium (NO^+). Ce dernier a été généré *in situ* par l'action de l'acide sulfurique sur le nitrite de sodium (NaNO_2). L'obtention du groupement hydroxyle à partir du sel de diazonium implique enfin une étape d'hydrolyse.

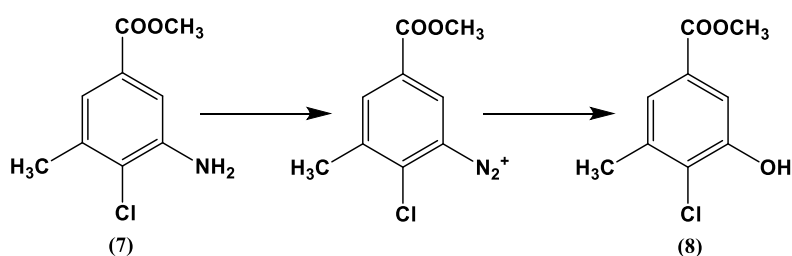


Figure 181 : Réaction de diazotation-hydroxylation sur le 3-amino-4-chloro-5-méthylbenzoate de méthyle.

Différents protocoles de diazotation-hydroxylation, effectués sur des composés aromatiques plus ou moins substitués, sont disponibles dans la littérature. Selon les procédures décrites, le nitrite de sodium peut être ajouté après dissolution en milieu aqueux ou acide ; aussi, la réaction peut être conduite en milieu plus ou moins dilué et à des températures variables (0°C, ambiante, reflux).

Plusieurs essais ont donc été conduits en se basant sur ces différentes méthodes (Tableau 23). Cependant, compte-tenu de la faible solubilité du 3-amino-4-chloro-5-méthylbenzoate de méthyle dans l'acide chlorhydrique, il est à noter que tous les essais ont été réalisés dans l'acide sulfurique. Dans tous les cas, le traitement du brut réactionnel a été effectué par extraction au chloroforme ; après évaporation à sec, les différentes phases organiques ont été analysées par CPG-SM afin de détecter la formation du produit attendu.

Tableau 23 : Différents protocoles mis en œuvre pour l'étape de diazotation-hydroxylation.

Essais	Références	NaNO ₂	H ₂ SO ₄	H ₂ O	Conditions
1	Singh <i>et al.</i> , 2012	1 éq. dans H ₂ SO ₄	266 µL	2 mL	0-5°C, 4 h.
2	Mei <i>et al.</i> , 2013	1,1 éq. dans H ₂ O	1,5 mL	18 mL	0°C, 50 min. puis reflux, 12 h.
3	Koh <i>et al.</i> , 2003	1,1 éq. dans H ₂ SO ₄	800 µL	20 mL	0°C, 4 h. puis reflux, 15 min. Sous argon, à l'obscurité
4	Shinji <i>et al.</i> , 2006	1 éq. dans H ₂ O	277 µL	4,43 mL	0°C, 5 min. puis reflux, 30 min. Sulfate de cuivre (II)
5	Song <i>et al.</i> , 2002	1,1 éq. dans H ₂ SO ₄	133 µL	10 mL	60°C, 3h30 puis reflux, 2 h.

Le premier essai, effectué à froid (Singh *et al.*, 2012), ainsi qu'un second, en milieu dilué et impliquant un chauffage à reflux (Mei *et al.*, 2013), n'ont pas permis l'obtention du 4-chloro-3-hydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle. Un troisième protocole a ensuite été mis en œuvre sous atmosphère inerte (flux d'argon) et à l'abri de la lumière pour éviter d'éventuelles réactions de couplage oxydant entre les phénols et les sels de diazonium formés (Koh *et al.*, 2003). Malgré plusieurs tentatives, ces conditions appliquées à notre substrat n'ont pas permis la formation du composé attendu. En effet, l'analyse des phases organiques par CPG-SM a révélé des profils complexes. On note la présence du

composé aminé (**7**) ainsi que du 4-chloro-3-méthylbenzoate de méthyle, résultat d'une déamination du cycle. L'étude des spectres de masse des autres composés n'a pas permis l'attribution des structures correspondantes. Néanmoins, les masses élevées obtenues suggèrent la formation de produits de couplage.

Deux autres protocoles ont ensuite été mis en œuvre soit en présence de sulfate de cuivre comme catalyseur (essai 4 ; Shinji *et al.*, 2006) soit en chauffant tout au long de la réaction (essai 5 ; Song *et al.*, 2002). Les chromatogrammes obtenus pour ces deux essais ont mis en évidence la présence d'un composé possédant un spectre de masse avec un pic moléculaire à $m/z = 200$ et pouvant correspondre au composé hydroxylé (**8**).

Une purification par CCM préparative dans le chloroforme a été entreprise afin d'isoler le composé attendu. Celui-ci se présente sous la forme d'un solide de couleur orangé. Sa caractérisation par SMHR (m/z $[M-H]^+ = 201,0312$; $C_9H_{10}ClO_3$) ainsi que par RMN 1H a permis de confirmer qu'il s'agit bien du 4-chloro-3-hydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle, obtenu avec de faibles rendements de 2 et 8 % pour les essais 4 et 5, respectivement. Le rendement de 2 % obtenu pour l'essai 4 est très faible par rapport à celui de 59 % décrit par Shinji *et al.* (2006). En effet, leurs travaux ont porté sur un composé de structure proche du composé (**7**) mais non chloré (Figure 182).

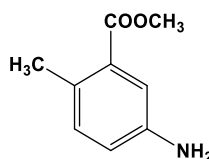


Figure 182 : Structure du composé étudié par Shinji *et al.* (2006).

La présence du chlore en *ortho* de la fonction amine sur le composé (**7**) pourrait donc avoir une influence sur sa réactivité et être responsable du faible rendement observé.

Malgré plusieurs tentatives, le 4-chloro-3-hydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle n'a pas pu être obtenu en quantité suffisante pour pouvoir envisager la suite de cette stratégie de synthèse.

II.3.3. Discussion - conclusion

Concernant la stratégie S4, deux voies de synthèse du noyau C ont été prospectées mais une étape limitante a été rencontrée pour chacune d'elle (Figure 183).

Dans un premier temps, l'introduction d'un groupement méthyle sur le 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle a été envisagée en deux étapes : une formylation suivie d'une réduction. Cependant, les différents essais de formylation n'ont pas conduit à l'obtention du produit attendu et n'ont donc pas permis de continuer dans cette voie.

Dans un second temps, une stratégie de synthèse du noyau C a été proposée à partir du 4-chloro-3-méthylbenzoate de méthyle commercial. Si les premières étapes de nitration et de réduction conduisent à des rendements satisfaisants, l'étape de diazotation-hydroxylation reste néanmoins très limitante, d'autant plus que l'obtention de la cladoxanthone A nécessite encore 4 étapes : déprotection de l'acide par saponification, formation du chlorure d'acyle, couplage par acylation de Friedel-Crafts et enfin couplage oxydant. L'étape de diazotation-hydroxylation devrait donc être optimisée pour permettre l'accumulation du produit hydroxylé **(8)** et continuer dans cette voie de synthèse.

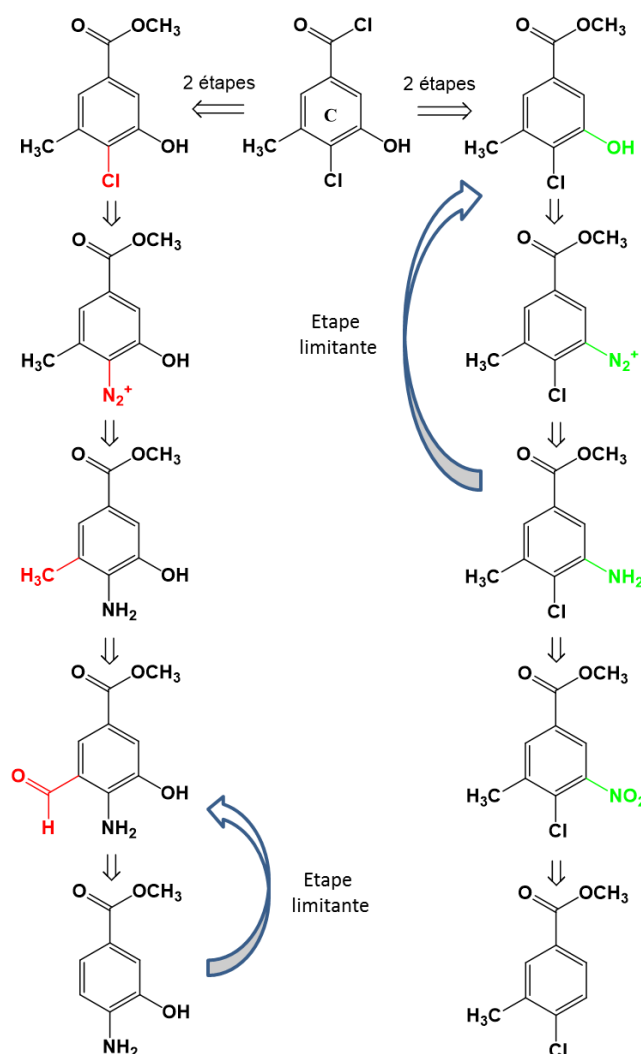


Figure 183 : Stratégie S4 : étapes limitantes des deux voies de synthèse envisagées pour le précurseur C.

Dans un troisième temps, une nouvelle stratégie, notée S5, a donc été explorée à partir d'un composé commercial issu d'une synthèse à façon : l'acide 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoïque. Il s'agit d'un composé dihydroxylé qui, après chloration, devrait permettre l'obtention du précurseur C. Enfin, une étape de couplage avec le précurseur A (4,6-dichlororésorcinol) en présence du réactif d'Eaton conduirait à la formation de la cladoxanthone A.

II.4. Stratégie S5

Le couplage en une seule étape envisagé dans cette stratégie repose sur l'utilisation du réactif d'Eaton (pentaoxyde de phosphore dans l'acide méthanesulfonique) comme alternative à l'emploi de l'acide polyphosphorique ; ce type de couplage est souvent retrouvé dans la littérature pour la synthèse de xanthones (Moreau *et al.*, 2002 ; Dai *et al.*, 2013 ; Zou *et al.*, 2012) et nécessite la présence de deux fonctions hydroxyle sur le précurseur C : le groupement OH de la fonction acide ainsi qu'un groupement hydroxyle en *ortho* du carbone portant la fonction COOH.

Les difficultés précédemment rencontrées ont mené au choix d'un nouveau composé déjà hydroxylé et méthylé dans des positions adéquates : l'acide 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoïque. Cependant, ce composé est plutôt polaire et une première étape d'estérification a été effectuée afin d'assurer un suivi réactionnel par CPG-masse. Une étape de chloration suivie de la déprotection du produit estérifié devrait ensuite permettre d'obtenir le noyau C attendu (Figure 184).

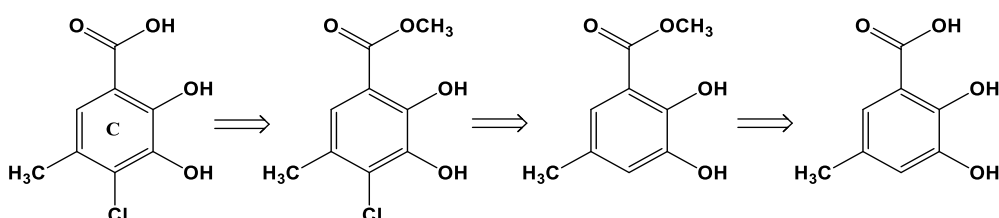


Figure 184 : Schéma rétrosynthétique du noyau C à partir de l'acide 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoïque.

II.4.1. Estérification

La réaction a été conduite dans le méthanol en présence d'acide sulfurique, pendant 24 heures à reflux (80°C) (Figure 185).

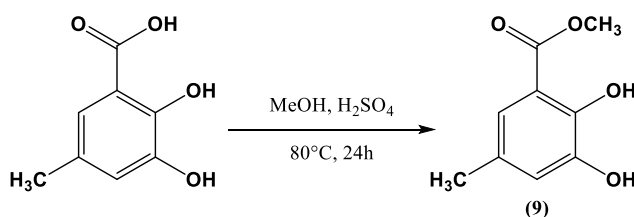


Figure 185 : Estérification de l'acide 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoïque.

La purification, réalisée par CCM préparative dans le chloroforme, a permis d'obtenir le composé souhaité **(9)** avec un rendement de 80 % (solide vert kaki). Son identification structurale a été effectuée par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif (m/z $[M-H]^+ = 183,0653$; $C_9H_{11}O_4$) ainsi que par RMN 1H et confirme la formation du 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle attendu.

La seconde étape a ensuite consisté à chlorer le 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle en position 4. Néanmoins, celle-ci s'est avérée délicate au vue de la polysubstitution de ce composé.

II.4.2. Chloration

La chloration de composés aromatiques est largement décrite dans la littérature avec l'utilisation de nombreux agents chlorants tels que le dichlore (Harvey et Norman, 1961) ou encore l'hypochlorite de *tert*-butyle (Lengyel *et al.*, 1998). Afin d'améliorer la régiosélectivité des réactions de chlorination, des conditions plus originales sont également proposées *via* l'utilisation de systèmes ozone/chlorure de potassium (Narender *et al.*, 2002) et hypochlorite de *tert*-butyle/zéolites (Smith *et al.*, 1999) par exemple.

Une autre méthode de chloration classiquement employée, plus respectueuse de l'environnement que le dichlore, est l'utilisation du *N*-chlorosuccinimide (NCS). Tanemura *et al.* (2003) ont développé une méthode douce de chloration de cycles aromatiques mono- et disubstitués en présence de NCS et de chlorure de fer (III) (FeCl_3 : catalyseur de type acide de Lewis) ou de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3), dans l'acétonitrile. Dans un premier temps, différents essais ont donc été effectués en se basant sur le protocole de ces auteurs mais dans le diméthylformamide (DMF), le composé **(9)** étant insoluble dans l'acétonitrile (Figure 186).

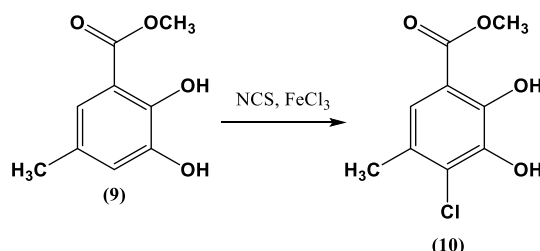


Figure 186 : Chloration du 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle.

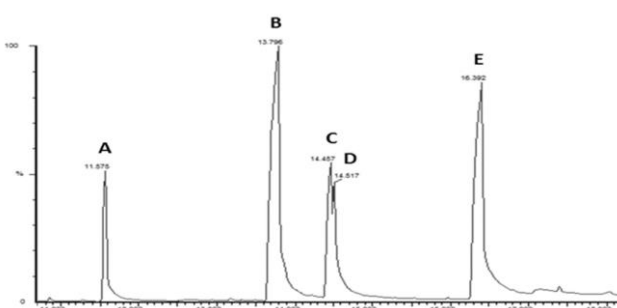
Après solubilisation du composé **(9)** dans le DMF, le NCS et le FeCl_3 ont été ajoutés puis la réaction a été conduite pendant des temps variables à température ambiante. Les conditions mises en œuvre pour les différents essais sont reportées dans le Tableau 24.

Lors des 3 essais de chloration, la formation de complexes entre le FeCl_3 et les groupements hydroxyle des composés a été observée, rendant ainsi le suivi de réaction par CCM ainsi que la purification difficiles. Après évaporation à sec des bruts réactionnels et reprise par du chloroforme, il est cependant possible de rompre ces complexes par traitement par une solution aqueuse à 10 % d'acide chlorhydrique. Ce traitement entraîne néanmoins des pertes non négligeables de produit. Les phases organiques ont ensuite été évaporées à sec puis analysées par CPG-SM.

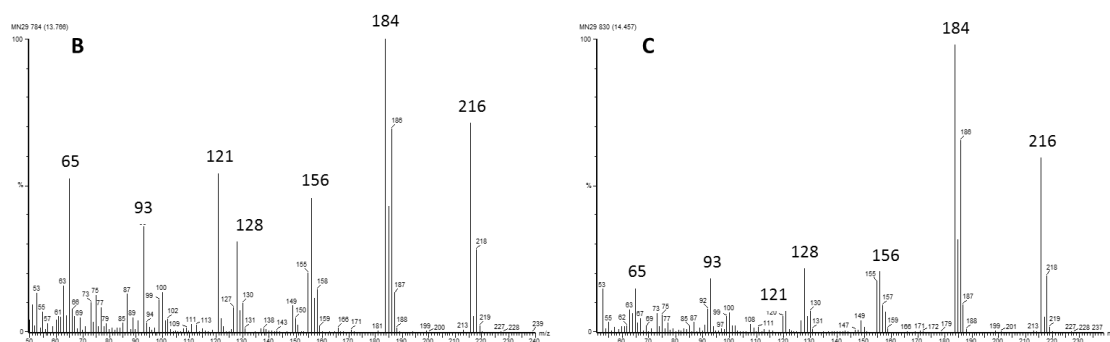
Tableau 24 : Conditions opératoires mises en œuvre pour la chloration du 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle dans le DMF en présence de NCS et FeCl₃.

Essais	Masse produit de départ (mg)	NCS (éq.)	FeCl ₃ (éq.)	Durée (h)
1	63	1,2	0,1	22
2	252	1	1,1	40
3	124	1	2	40

Les chromatogrammes obtenus par analyse CPG-SM pour les 3 essais ont montré des profils très semblables révélant deux composés majoritaires correspondant aux pics B et E. De même, les pics notés A, C et D correspondent à des composés présents en proportions similaires. A titre d'exemple, la Figure 187 présente le profil correspondant à l'essai de chloration n°1.

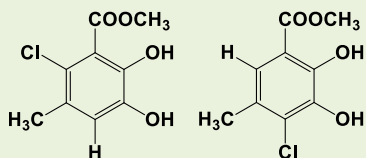
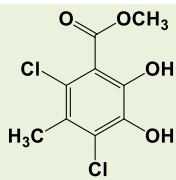
**Figure 187 : Chromatogramme de la phase organique obtenu pour l'essai 1 de chloration du 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle (obtenu par CPG-masse) et structures des composés identifiés.**

Les spectres de masse des pics A, B, C et E ont permis d'élucider les structures des composés correspondants (Tableau 25). Le pic A ($m/z = 182$) correspond au composé de départ (**9**), alors que les pics B et C, qui possèdent des temps de rétention bien distincts, présentent des spectres de masses très proches avec un pic moléculaire à $m/z = 216$ et des amas isotopiques caractéristiques de composés monochlorés (Figure 188).

**Figure 188 : Spectres de masse obtenus en impact électronique pour les composés monochlorés (pics B et C).**

Ces signaux B et C sont attribués aux deux régioisomères monochlorés. La structure du composé correspondant au pic D ($m/z = 230$) n'a pas été élucidée alors que le pic E, avec un rapport $m/z = 250$, semble correspondre au produit dichloré ; les amas isotopiques caractéristiques d'un composé dichloré ont d'ailleurs été repérés sur le spectre de masse de ce dernier.

Tableau 25 : Données CPG-SM et structures des composés présents dans la phase organique des 3 essais.

Composés	Temps de rétention	m/z pic moléculaire	Structure proposée
A	11,58 min	182	Composé (9)
B / C	13,80 min / 14,46 min	216	 Produits monochlorés
E	16,40 min	250	 Produit dichloré

Les deux produits monochlorés semblent donc avoir été formés au cours des 3 essais de chloration, dont un est nettement majoritaire (pic B) par rapport à l'autre (pic C). Afin de déterminer par analyse RMN lequel correspond au produit (10) attendu (chloré en position 4), des essais de purification ont été entrepris ; dans tous les cas, les conditions utilisées n'ont pas conduit à une séparation optimale des composés, mais à un mélange de plusieurs produits.

Néanmoins, une fraction obtenue par chromatographie éclair en phase normale, et contenant les deux composés monochlorés, a été analysée par CPG-SM et RMN (^1H , ^{13}C , HMQC et HMBC). L'analyse bidimensionnelle a notamment permis d'attribuer de façon certaine les structures correspondant aux pics B et C (Figure 189).

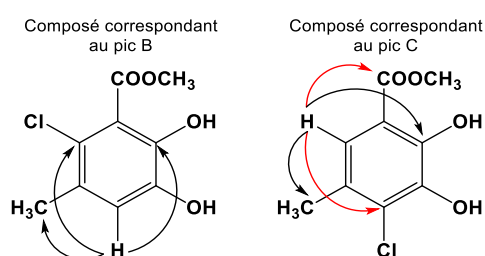
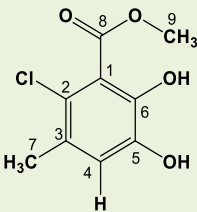
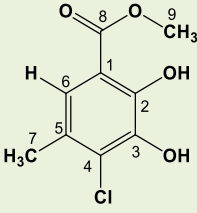


Figure 189 : Corrélations observées en HMBC permettant l'attribution des structures correspondant aux pics B et C.

Les résultats obtenus ont donc mis en évidence que le pic majoritaire B correspond au produit monochloré en *ortho* du carbone portant la fonction ester (**10a**), alors que le pic C minoritaire correspond au produit (**10**) attendu, chloré en position 4.

Les déplacements chimiques obtenus en RMN ^1H et ^{13}C pour les deux composés monochlorés sont présentés dans le Tableau 26 :

Tableau 26 : Déplacements chimiques obtenus par analyse RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz) pour les composés (10**) et (**10a**) (dans CDCl_3).**

Composé	no.	^1H	^{13}C
 <p>2-chloro-5,6-dihydroxy-3-méthylbenzoate de méthyle (B)</p> <p>= composé (10a)</p>	1		112,2 C
	2		123,8 C
	3		129,1 C
	4	6,98 s	120,8 CH
	5		143,7 C
	6		148,3 C
	7	2,30 s	20,9 CH_3
	8		170,7 C
	9	4,01 s	53,0 OCH_3
	OH-5	11,04 br s	
	OH-6	5,69 br s	
 <p>4-chloro-2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle (C)</p> <p>= composé (10)</p>	1		110,4 C
	2		147,6 C
	3		141,7 C
	4		126,2 C
	5		127,5 C
	6	7,26 s	120,7 C
	7	2,31 s	19,7 CH_3
	8		170,5 C
	9	3,95 s	52,7 OCH_3
	OH-2	5,94 br s	
	OH-3	10,82 br s	

s : singulet ; *br s* : singulet élargi

Sur la base des analyses RMN, la proportion du 4-chloro-2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle a été évaluée dans le mélange, puis rapportée à la masse d'échantillon récupérée après purification. Ainsi, la chloration du composé (**9**) a conduit à l'obtention du produit (**10**) attendu avec un rendement estimé à environ 9 %.

Même s'il est faible, ce rendement reste néanmoins significatif et met en évidence que la chloration, en présence de NCS et de FeCl_3 dans le DMF, conduit à la formation du composé monochloré attendu.

D'autres conditions de chloration de composés aromatiques ont donc été prospectées afin d'augmenter la régiosélectivité en faveur du composé **(10)**. Certains auteurs ont en effet observé des régiosélectivités variables selon le solvant employé pour les réactions (Smith *et al.*, 1999 ; Gan *et al.*, 2012). L'utilisation d'un solvant autre que le DMF pourrait permettre, dans notre cas, d'améliorer la régiosélectivité de la chloration en faveur du produit attendu. L'essai 4 a donc été mis en œuvre dans le dichlorométhane (Tableau 27).

Tableau 27 : Essais de chloration en présence de FeCl_3 dans le dichlorométhane, et en présence de peroxyde d'hydrogène et d'acide chlorhydrique.

Essais	Masse produit de départ (mg)	Conditions	Solvant
4	200	NCS (1 éq.), FeCl_3 (2 éq.), 65h, TA	CH_2Cl_2
5	100	HCl (2 éq.), H_2O_2 (1,1 éq.), à l'obscurité, ajout lent de H_2O_2 à 10-15°C puis 24h à reflux	MeOH

Par ailleurs, la chloration peut être effectuée en présence d'acide chlorhydrique et de peroxyde d'hydrogène (Barhate *et al.*, 1998 ; Barhate *et al.*, 1999 ; Mukhopadhyay *et al.*, 1999). Cette méthode présente l'avantage de s'affranchir de l'utilisation de catalyseurs à base de métaux (dont FeCl_3) et donc de faciliter l'étape de purification. De plus, ce système de chloration est plus respectueux de l'environnement puisqu'il permet la formation *in situ* du dichlore en phase aqueuse.

L'essai 5 a donc été mis en œuvre dans le méthanol en présence de peroxyde d'hydrogène et d'acide chlorhydrique, en se basant sur les travaux décrits par Vyas *et al.* (2003) (Tableau 27).

L'analyse par CPG-SM a été effectuée sur les deux bruts réactionnels (après lavages par une solution de HCl 10 % pour l'essai 4 et lavages à l'eau pour l'essai 5). Les chromatogrammes obtenus sont présentés sur la Figure 190.

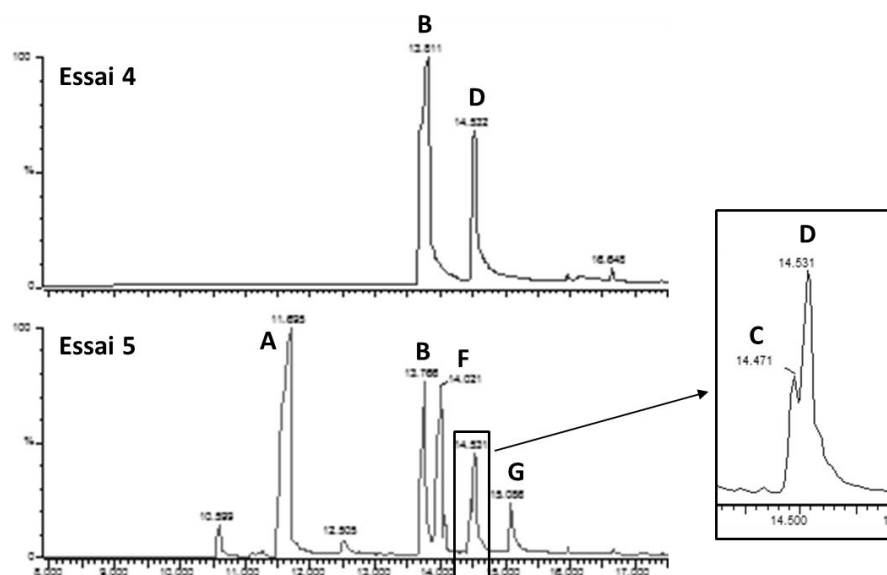


Figure 190 : Chromatogrammes obtenus par analyse CPG-SM pour les essais de chloration 4 et 5.

Dans le cas de l'essai 4, on retrouve les pics B et D précédemment détectés lors des essais 1 à 3, et correspondant respectivement au composé **(10a)** et au composé de pic moléculaire $m/z = 230$.

On constate par ailleurs que tout le produit de départ a été consommé dans ces conditions là. Malheureusement, le produit **(10)** ne s'est pas formé. Ainsi, il semblerait que l'utilisation du dichlorométhane rende la chloration encore plus régiosélective que le DMF mais malheureusement pas en faveur du composé chloré attendu.

Pour l'essai 5, on retrouve les composés précédemment décrits et on note qu'une grande partie du composé de départ (pic A) n'a pas réagi. A ces composés s'ajoutent deux nouveaux composés de structure non élucidées (pics notés F et G) présentant des rapports m/z respectifs de 272 et 286. Enfin, le composé chloré attendu (pic C) est observé en faible proportion. Ces conditions sont donc encore moins favorables qu'en présence de NCS et FeCl_3 pour obtenir le produit **(10)** puisque, d'une part, il reste beaucoup de produit de départ, et d'autre part, de nombreux coproduits sont formés.

Une autre méthode couramment employée pour la chloration de composés aromatiques consiste à utiliser le chlorure de sulfuryle (SO_2Cl_2) (Bugnet *et al.*, 2002). Selon le protocole décrit par Elix et Portelli (1990), un autre essai (noté 6) a donc été effectué en présence de SO_2Cl_2 , dans l'éther diéthylique anhydre et à température ambiante. Après 22 heures de réaction, le brut réactionnel a été

élevaporé à sec puis repris dans le dichlorométhane pour être analysé par CPG-SM. Le chromatogramme obtenu est présenté sur la Figure 191.

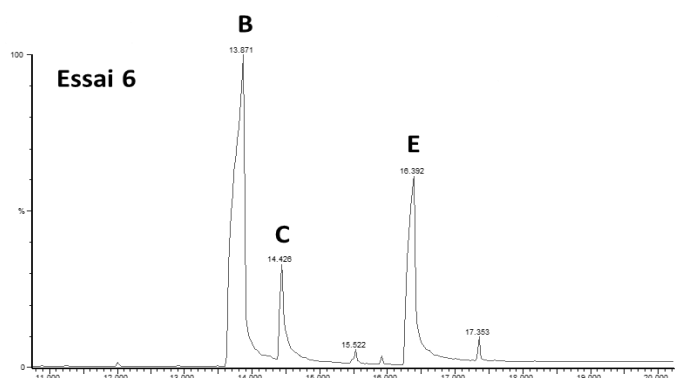


Figure 191 : Chromatogramme obtenu par analyse CPG-SM pour l'essai de chloration n°6.

Dans ce cas, on retrouve les pics B et C précédemment détectés correspondant respectivement aux régioisomères monochlorés (**10a**) et (**10**). On constate par ailleurs que tout le produit de départ a été consommé dans ces conditions là et que le produit dichloré, correspondant au pic E est également formé. Au même titre que le système NCS/FeCl₃, l'utilisation du chlorure de sulfuryle permet l'obtention du composé attendu (bien qu'il soit minoritaire par rapport à son régioisomère). Aussi, la réaction avec SO₂Cl₂ présente deux avantages majeurs par rapport au système NCS/FeCl₃ :

- Les lavages par une solution de HCl à 10 % ne sont pas nécessaires, ce qui limite les pertes de masse ;
- Le brut réactionnel est moins complexe ;
- Pour des temps de réaction identiques, tout le produit de départ est consommé.

La purification du produit chloré attendu (**10**) a donc été plus simple à mettre en œuvre sur ce brut comparé aux autres essais de chloration. Environ 7 mg de ce composé ont pu être isolés après purification par CCM préparative, soit un rendement de 3 % qui s'avère être 3 fois plus faible que celui estimé avec le système NCS/FeCl₃.

II.4.3. Discussion - conclusion

Rappelons que cette stratégie S5 a été envisagée en trois étapes : l'estérification de la fonction acide (afin d'effectuer le suivi de la réaction par analyse CPG-SM), suivie d'une chloration en position 4 du cycle, et enfin une déprotection de l'acide pour effectuer les essais de couplage.

L'estérification a conduit à l'obtention du composé **(9)** avec un rendement classique de 80 %. La chloration de ce dernier a ensuite été mise en œuvre en présence de NCS et d'un acide de Lewis (FeCl_3), conditions fréquemment retrouvées dans la littérature (essais 1 à 3). L'analyse des bruts par CPG-SM ainsi que par RMN mono- et bidimensionnelle a permis de mettre en évidence la formation du composé monochloré en position 4 **(10)** avec un rendement estimé à environ 9 %.

L'essai de chloration 4 a été effectué dans un autre solvant (dichlorométhane au lieu du DMF) et a conduit à l'obtention de deux composés, dont le composé **(10a)** majoritaire et un composé avec un pic moléculaire à $m/z = 230$. L'utilisation de dichlorométhane ne permet donc pas d'obtenir le composé souhaité, mais au contraire, la régiosélectivité est dans ce cas en faveur du composé **(10a)**.

L'essai de chloration 5, qui permet la formation de l'agent chlorant *in situ* (Cl_2) en présence de peroxyde d'hydrogène et d'acide chlorhydrique, a également été réalisé. L'analyse par CPG-SM a révélé la formation du composé **(10)** ; cependant, le brut est complexe et laisse supposer un rendement en composé attendu inférieur à celui obtenu pour les essais 1 à 3.

L'essai de chloration 5, en présence de chlorure de sulfuryle a conduit à un brut réactionnel plus simple à purifier. Néanmoins, le composé **(10)** a été obtenu avec un faible rendement de 3 %.

Les différents essais mis en œuvre ont donc permis d'obtenir le composé attendu avec de faibles rendements. Pour la suite du travail, il conviendrait de mener une étude approfondie concernant l'étape de chloration afin de déterminer des conditions permettant une chloration régiosélective en position 4. Des articles récents décrivent des méthodes de chloration *para*-sélectives de phénols et analogues, en présence de NCS et d'acide *para*-toluènesulfonique (Bovonsombat *et al.*, 2010 ; Mahajan *et al.*, 2012), ou encore en présence de chlorate de sodium (NaClO_3) en tant qu'oxydant et HCl comme agent de chloration (Sharma et Agarwal, 2014). *A contrario*, très peu d'études traitant de l'*ortho*-chloration sélectives de phénols et dérivés sont disponibles dans la littérature.

Une des stratégies envisagées afin de moduler la régiosélectivité en faveur du composé **(10)** est de réaliser la chloration sur le composé **(9)**, après protection des fonctions hydroxyles par le 2,2-diméthoxypropane (formation d'un acétal). En amont de la chloration, on pourrait également envisager de bloquer temporairement la position 6 par introduction d'un groupement nitro.

II.5. Bilan sur la synthèse de la cladoxanthone A

Les stratégies de synthèse S4 et S5 présentées précédemment constituent une étude préliminaire concernant la cladoxanthone A, et avaient pour objectif la préparation des deux précurseurs présentés sur la Figure 192. Les travaux effectués ont ouvert la voie à ces deux stratégies en mettant notamment en évidence que l'obtention des composés **(8)** et **(10)** est possible. Néanmoins, la préparation de ces deux composés nécessite une mise au point méthodique afin d'accéder aux deux précurseurs, et pouvoir ainsi envisager des essais de couplage conduisant à la cladoxanthone A.

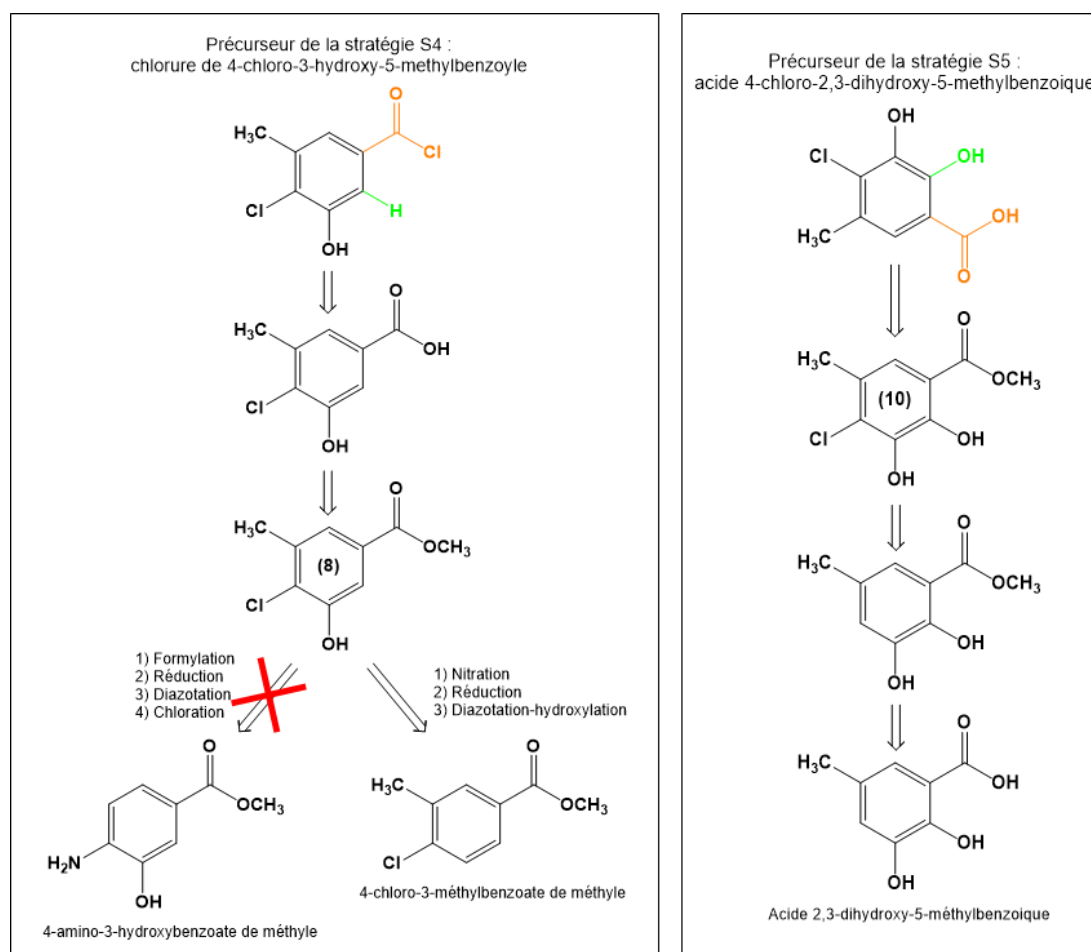


Figure 192 : Précurseurs des stratégies de synthèse de la cladoxanthone A.

La croix rouge signale l'abandon de la voie de synthèse à partir du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle.

Dans le cas de la stratégie S4, la voie de synthèse utilisant le 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle comme composé de départ a été rapidement abandonnée. En effet, dès la première étape de formylation le composé attendu n'a pas été formé. L'introduction du groupement méthyle en position 5 du cycle n'a donc pas pu être effectuée, et une autre voie de synthèse a été entreprise à partir du 4-chloro-3-méthylbenzoate de méthyle commercial. Dans ce cas, il s'agissait d'incorporer un groupe

hydroxyle en position *ortho* du chlore par l'intermédiaire de trois étapes successives (nitration, réduction puis diazotation-hydroxylation). Bien que les deux premières étapes aient conduit à des rendements convenables, des difficultés ont été rencontrées pour la réaction de diazotation-hydroxylation. En effet, nous avons mis en évidence que l'obtention du composé hydroxylé (**8**) était possible, mais de faibles rendements ont été obtenus. Cette étape nécessite donc une amélioration et la mise en œuvre d'autres conditions opératoires. Par exemple, l'utilisation d'acide *para*-toluènesulfonique (Tang et Jiao, 2012) ou d'acide acétique (Siddiki *et al.*, 2013) à la place de l'acide sulfurique, ou encore du nitrite de *tert*-butyle au lieu du nitrite de sodium (Zhang *et al.*, 2011) peut être envisagée.

Etant donné les difficultés rencontrées lors de la stratégie S4, une autre voie de synthèse a été entreprise à partir de l'acide 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoïque commercial (stratégie S5). Dans un premier temps, l'estérification de la fonction acide a été réalisée afin de pour assurer le suivi des réactions ultérieures par analyse CPG-SM. La chloration du cycle en position 4 a ensuite été engagée. Les systèmes utilisant le NCS et le FeCl₃ d'une part, et le SO₂Cl₂ d'autre part, sont ceux qui ont donné les résultats les plus encourageants, le composé chloré (**10**) ayant été obtenu avec des rendements respectifs de 9 et 3 %. La chloration est donc possible en position 4 mais une étude approfondie devra permettre d'améliorer la régiosélectivité de la réaction en faveur du composé souhaité.

Pour les deux stratégies, on peut raisonnablement penser qu'il est possible d'obtenir les précurseurs souhaités. En effet, deux réactions classiques sont à effectuer à partir du composé (**8**) (saponification de l'ester puis chloration de l'acide) pour obtenir le chlorure de 4-chloro-3-hydroxy-5-méthylbenzoyle, et une seule réaction de saponification de l'ester à partir du composé (**10**) pour obtenir l'acide 4-chloro-2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoïque. L'optimisation de l'étape de diazotation-hydroxylation dans le cas de la stratégie S4, et de l'étape de chloration dans le cas de la stratégie S5, devrait donc permettre de préparer les précurseurs afin de les engager dans les essais de couplage.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Conclusion & Perspectives

Les lichens sont des organismes remarquables dont l'adaptabilité physiologique leur permet de faire face à des conditions environnementales extrêmes. Cette résistance est souvent corrélée à la présence de métabolites originaux qui semblent avoir des rôles essentiels dans la protection des lichens contre les agressions extérieures telles qu'une exposition extrême aux rayons UV, une forte dessiccation, ou encore l'attaque de pathogènes. Les lichens constituent en ce sens une incroyable source de diversité moléculaire qui suscite un intérêt grandissant de la part de la communauté scientifique.

Ce travail a été mené selon deux axes majeurs. D'une part, nous nous sommes proposé de rechercher des molécules lichéniques à fort pouvoir antimicrobien. Une étude phytochimique de trois lichens récoltés en Limousin a été entreprise. Le choix de ces espèces a été basé sur les données bibliographiques ainsi que sur un criblage analytique de 17 espèces récoltées en Haute-Vienne et en Corrèze. D'autre part, une étude préliminaire a été réalisée concernant la synthèse de deux composés actifs parmi ceux isolés : l'acide usnique et la cladonanthone A.

Dans une première partie, l'activité antimicrobienne des trois extraits acétoniques a été caractérisée par une méthode adaptée du Challenge Test ainsi que des tests de dilution en milieu liquide. Les résultats obtenus par ces deux méthodes ont suggéré la présence, dans les extraits, de composés actifs autres que l'acide usnique. Cette hypothèse a été confirmée par la technique de bioautographie, qui a permis de repérer, outre l'acide usnique, d'autres composés actifs sur *S. aureus* dans chacun des extraits. Les effets bactéricide et bactériostatique des extraits seraient donc induits par une action synergique ou cumulée des composés qu'ils renferment.

Le fractionnement bioguidé des extraits a ensuite été entrepris et a conduit à l'isolement de 16 composés appartenant à 7 familles moléculaires. Cette diversité structurale témoigne de la pluralité des voies de biogenèse, généralement sous contrôle enzymatique, mises en jeu au sein des lichens. Les deux isomères de l'acide usnique ont été isolés : l'acide (+)-usnique **Uf1-Fc1** chez *U. florida* et *F. caperata*, et l'acide (-)-usnique **Ci4** chez *C. incrassata*. Trois dibenzofuranes ont été obtenus exclusivement à partir de *C. incrassata*. De structures très proches, ils sont substitués par des chaînes aliphatiques. Il s'agit des acides didymique **Ci2**, condidymique **Ci3** et subdidymique **Ci1**. Un tel constat suggère que les lichens synthétisant peu d'acide usnique produisent, en compensation, des dibenzofuranes. Des depsidones, spécifiques mais très communes chez les lichens, ont également été

isolées : deux depsidones substituées par des chaînes aliphatiques : les acides physodique **Uf5** et 3-hydroxyphysodique **Uf6** ; et l'acide protocétrarique **Fc2**. Aussi, l'étude phytochimique a conduit à l'isolement de 4 depsides : l'acide prasinique **Ci5** possédant deux longues chaînes latérales ; les acides thamnolique **Uf2**, squamatique **Ci8** et évernique **Uf4**. Un acide aliphatique, l'acide capératique **Fc3**, le peroxyde d'ergostérol **Fc4**, et un phtalide, le 5,7-dihydroxy-6-méthylphtalide **Uf3** ont également été isolés. Une xanthone nouvelle **Ci6**, la cladoxanthone A a été extraite du lichen *C. incrassata*. Celle-ci possède une structure atypique par rapport aux xanthes classiquement reportées dans la littérature, suggérant ainsi une voie de biogenèse originale, non décrite jusqu'à présent. Parmi ces métabolites, certains ont été isolés pour la première fois et viennent compléter les données relatives aux différents chémotypes des trois espèces.

Sur les 16 composés, une dizaine d'entre eux, dont la cladoxanthone A, a montré une activité sur *S. aureus* lors des tests par bioautographie. Ce composé a malheureusement été isolé en trop faible quantité pour nous permettre d'effectuer des tests biologiques supplémentaires. Pour une prochaine étude, il serait envisageable de se focaliser sur la recherche de xanthes dans d'autres espèces de *Cladonia* à apothécies rouges. On pourrait ainsi espérer identifier d'autres xanthes chlorées, et par la même occasion, confirmer et approfondir l'hypothèse d'une voie de biosynthèse originale.

Pour les métabolites actifs par bioautographie et isolés en quantité suffisante, les pourcentages d'inhibition de croissance et CMI ont été déterminés sur *S. aureus* par une technique de dilution en milieu liquide. Les CMI sur *S. aureus* ont été ici déterminées pour la première fois pour les acides didymique, condidymique et capératique. Des activités similaires ont été mises en évidence entre les deux isomères de l'acide usnique. De plus, les acides didymique et condidymique ont montré une activité semblable à celle de l'acide usnique. Pour tous les composés testés, une activité plus de 40 fois supérieure à celle du Phénonip® et des CMI seulement 6 à 10 fois plus faibles que la ciprofloxacine, ont été mises en évidence.

L'ensemble des tests d'activité antimicrobienne effectués au cours de cette étude permet également de supposer des modes et/ou cinétiques d'action différents des acides didymique et condidymique entre eux, mais également par rapport à l'acide usnique. L'effet bactéricide rapide de l'extrait de *C. incrassata* sur *S. aureus* serait ainsi induit par ces deux dibenzofuranes à longues chaînes.

Pour conclure sur cette première partie, les acides didymique et condidymique semblent être des candidats potentiels pour une utilisation en tant que conservateurs. Par rapport à l'acide usnique, ils présentent l'avantage de ne pas être colorés et plus facilement solubles. De plus, l'acide didymique n'induirait pas de dermatite de contact (Mitchell et Shibata, 1969). Néanmoins, les quantités extraites ont permis de déterminer leur activité antibactérienne uniquement sur *S. aureus*. Des tests sur d'autres souches microbiennes devraient donc être effectués dans une étude ultérieure afin de connaître leur spectre d'activité qui devra, dans l'idéal, être aussi large que celui du Phénonip®. Si c'est le cas, des tests de cytotoxicité et d'allergénicité devront être envisagés pour proposer leur utilisation en tant qu'agents de conservation dans les produits cosmétiques. L'accès à ces deux composés pouvant être limité par la faible ressource lichénique, leur synthèse, déjà décrite dans la littérature (Chester et Elix, 1981 ; Carvalho et Sargent, 1984), pourrait enfin être mise en œuvre.

Dans une seconde partie, la synthèse de deux composés de structures complexes, l'acide usnique et la cladoxanthone A, a fait l'objet d'une étude préliminaire. Une attention particulière a été portée au choix des réactifs afin d'éviter des incompatibilités avec une utilisation en industrie cosmétique.

L'acide usnique est un composé exclusivement lichénique qui possède de nombreuses propriétés biologiques. A ce titre, il est utilisé d'une part, comme conservateur dans certains produits cosmétiques ; il constitue d'autre part, une molécule plateforme dont les modifications structurales permettent de moduler les activités biologiques. Sachant que la ressource lichénique est limitée, il semble indispensable de définir et de développer une stratégie de synthèse de ce composé. La mise en œuvre de plusieurs stratégies de synthèse a permis d'optimiser la préparation de son précurseur, la méthylphloroacétophénone. Il est possible d'obtenir le composé attendu en une seule étape par méthylation directe de la phloroacétophénone commerciale, sans formation de coproduit, et avec un rendement acceptable de 43 %. Bien que le prix de la phloroacétophénone soit plus élevé que celui du phloroglucinol, la mise au point de l'étape de purification permet de récupérer le produit de départ n'ayant pas réagi pour le réengager dans une réaction suivante. Les premiers essais de couplage ont ensuite été réalisés selon une approche biomimétique impliquant une porphyrine octachlorée et métallée au fer comme catalyseur. A l'issue de cette pré-étude, nous avons mis en évidence que la porphyrine utilisée est capable d'induire le couplage oxydant entre deux molécules de méthylphloroacétophénone, pour former l'acide hydrousnique. Une étude complémentaire est nécessaire afin d'optimiser les conditions de couplage en étudiant notamment des porphyrines de structures variables. Différents métaux pourront être utilisés et le greffage d'un bras espaceur portant

une fonction imidazole, mimant la partie active d'une enzyme, pourrait permettre d'améliorer le pouvoir catalytique de la porphyrine utilisée.

Une étude préliminaire de la synthèse de la cladoxanthone A, isolée en très faible quantité, a également été entreprise dans l'objectif d'une part, de valider son analyse structurale et d'autre part, d'obtenir une masse suffisante pour évaluer ses propriétés biologiques.

Afin d'obtenir les précurseurs attendus, une première stratégie (S4) a été envisagée à partir, d'une part du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle, et d'autre part, du 4-chloro-4-méthylbenzoate de méthyle. L'étape de formylation n'ayant pas abouti sur le premier composé, cette voie de synthèse a très vite été abandonnée. En revanche, à partir du second composé, les étapes de nitration puis de réduction ont conduit à des rendements acceptables. Cependant, la réaction suivante de diazotation-hydroxylation a permis d'obtenir le produit attendu mais avec un très faible rendement. Cette étape devra donc être optimisée avant d'envisager la poursuite de cette stratégie.

Les difficultés rencontrées lors de la stratégie S4 nous ont conduits à imaginer une nouvelle stratégie (S5) à partir d'un autre composé commercial issu d'une synthèse à façon : l'acide 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoïque. Bien que son coût soit élevé, cette voie de synthèse présente un nombre limité d'étapes pour aboutir à la cladoxanthone A. Si la première étape d'estérification a conduit à un très bon rendement, l'étape de chloration s'est avérée beaucoup plus complexe. En effet, la polysubstitution du composé de départ rend difficile sa chloration sur la position souhaitée, et les premiers essais effectués mettent en évidence une régiosélectivité en défaveur du composé attendu. Pour la suite du travail, une nouvelle stratégie visant à moduler la régiosélectivité est actuellement mise en œuvre à partir de l'ester. Celle-ci consiste à protéger les fonctions hydroxyle par du 2,2-diméthoxypropane, en espérant rendre la position souhaitée plus réactive. Une dernière solution pour accéder au précurseur chloré attendu serait de protéger la position en *ortho* de la fonction ester, par un groupe nitro par exemple, puis de la déprotéger une fois la chloration effectuée.

Pour les deux stratégies, l'obtention des précurseurs avec des rendements corrects semble accessible moyennant l'optimisation des étapes limitantes. Il devrait donc être possible par la suite d'envisager les essais de couplage avec le 4,6-dichlororésorcinol pour conduire à la cladoxanthone A.

Pour conclure sur cette seconde partie, les résultats préliminaires obtenus sont encourageants que ce soit pour l'acide usnique ou pour la cladoxanthone A. Pour l'acide usnique, une étude approfondie incluant la mise au point de l'étape de couplage par une porphyrine devra être effectuée. Pour la cladoxanthone A, les deux stratégies proposées nécessiteront chacune l'optimisation d'une étape (diazotation-hydroxylation ou chloration) avant de pouvoir envisager les dernières étapes

permettant l'obtention des précurseurs. Une étude méthodique de l'étape de couplage devrait enfin être effectuée afin de conduire à la cladoxanthone A.

En se plaçant à l'interface des disciplines chimiques et biologiques, ce travail s'inscrit - *en l'illustrant* - dans un axe thématique fort du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles. Il constituera par ailleurs la base de travaux ultérieurs à caractères académiques et/ou finalisés consacrés aux stratégies d'exploitation de la diversité des molécules naturelles d'origine lichénique.

PARTIE D

DONNÉES EXPÉRIMENTALES

Partie D. Données expérimentales

I. REACTIFS ET SOLVANTS

L'origine des réactifs et des solvants utilisés est reportée dans le tableau suivant :

Réactif/solvant	Pureté	Fournisseur
4-chloro-3-méthylbenzoate de méthyle	> 98 %	TCI
Acétate d'éthyle	99,6 %	Acros Organics
Acétone	HPLC grade	Carlo Erba
	Pour analyses	Fischer
Acide (+)-usnique	98 %	Sigma Aldrich
Acide 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoïque	> 95 %	Interchim
Acide acétique	Glacial	Carlo Erba
Acide chlorhydrique	37 %	Fluka
Acide formique	≥ 99,3 %	VWR
Acide nitrique	65 %	Acros Organics
Acide orthophosphorique	85 %	Carlo Erba
Acide sulfurique	95 %	VWR
Agar	-	Fischer
Anhydride acétique	> 99 %	Sigma Aldrich
Bleu de bromothymol	95 %	Sigma Aldrich
bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium	98 %	Sigma Aldrich
Carbonate de sodium	98 %	Alfa Aesar
Chloroforme	99 %	SDS
Chlorure de fer (III)	Anhydre, extra pur	Fischer
Chlorure de sulfuryle	97 %	Sigma Aldrich
Chlorure d'étain	98 %, dihydraté	Acros Organics
Ciprofloxacine	≥ 98 %	Fluka
Cyanoborohydrure de sodium	95 %	Sigma Aldrich
Dichlorométhane	99 %	SDS
<i>N, N</i> -Diméthylformamide	99,8 % anhydre	Fischer
Ethanol	absolu	VWR
Ether de pétrole	98 %	VWR
Ether diéthylique	Pour analyses	VWR
Ferricyanure de potassium	99,4 %	Sigma Aldrich
Hydrogénocarbonate de sodium	≥ 99,7 %	Sigma Aldrich
Hydroxyde de sodium	98,5 %	Acros Organics
Iodométhane	99 %	Acros Organics
Méthanol	HPLC grade	Carlo Erba
	> 99,5 %	VWR

Méthanolate de sodium	5 M	TCI
<i>N</i> -chlorosuccinimide	98 %	Sigma Aldrich
<i>n</i> -Hexane	Pour analyses	Fischer
Nitrite de sodium	≥ 97 %	Alfa Aesar
Palladium sur charbon	10 %	Sigma Aldrich
Peroxyde d'hydrogène	30 %	VWR
Phénonip	14,5-16,5 % méthylparabène ; 3,5-4,3 % éthylparabène ; 1,7-2,3 % propylparabène ; 1,7-2,3 % isobutylparabène ; 3,7-4,3 % <i>n</i> -butylparabène ; 70,0-75,0 % phénoxyéthanol	Clariant International Ltd.
Phloroacétophénone	≥ 98 %	Alfa Aesar
Phloroglucinol	98 % anhydre	Alfa Aesar
Sabouraud (milieu de culture)	-	Bacto (Becton Dickinson)
Sulfate de cuivre	≥ 99 % anhydre	Sigma Aldrich
Sulfate de magnésium	Pur	Carlo Erba
Tétra(dichloro-phényl)porphyrine de fer	Non précisée	Frontier Scientific
Tétrahydrofurane	≥ 99,9 % anhydre	Sigma Aldrich
	99,5 %	Carlo Erba
Toluène	≥ 99,8 %	Fischer
Trichlorure de phosphore	> 99 %	Sigma Aldrich
Trifluorure de bore	96 %	Alfa Aesar
Tryptone soja (milieu de culture)	-	Bacto (Becton Dickinson)

II. METHODES DE SEPARATION

II.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM) préparative

Les chromatographies préparatives sur couche mince sont réalisées sur des plaques en verre 20 x 20 cm recouvertes de gel de silice 60 PF₂₅₄ (5-40 µm, Merck), préparées au laboratoire et sur des plaques commerciales (Macherey-Nagel SIL G-25 UV₂₅₄) (épaisseur de 2 mm).

II.2. Chromatographie Liquide Moyenne Pression (CLMP)

Les chromatographies liquides moyenne pression sont réalisées sur gel de silice (20-60 µm, Merck) ou de silice greffée C18 (LiChroprep® 15-25 µm, Merck) avec une pompe Büchi (C-605, C-615).

II.3. Chromatographie sur colonne sous pression : chromatographie éclair

L'appareil utilisé est un puriFlash 430 evo (Interchim), muni d'un détecteur UV, qui permet d'éluer sous pression les solutés (plage de débit jusqu'à 200 mL/min avec plage de pression de retour jusqu'à 30 bar). Des colonnes pré-packées de silice (40 g, 20-40 µm, Grace) ou de silice greffée C18 (80 g, 20-40 µm, Grace) sont employées.

II.4. Chromatographie Circulaire Centrifuge (CCC)

L'appareil utilisé est un Chromatotron® (Harrison Research modèle 8924) fonctionnant avec une pompe péristaltique. La phase stationnaire est constituée d'une plaque en verre circulaire (20 cm de diamètre) recouverte de gel de silice 60 PF₂₅₄ contenant du plâtre qui sert de liant (Merck), sur une épaisseur de 2 mm. L'élution des composés est suivie à 254 nm à l'aide d'une lampe UV.

II.5. Chromatographie liquide d'exclusion stérique sur colonne ouverte

Les chromatographies liquides d'exclusion stérique sont effectuées sur colonne ouverte à pression atmosphérique sur gel de Sephadex® LH-20 (Sigma Aldrich).

III. APPAREILLAGES & TECHNIQUES ANALYTIQUES

III.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince sont réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice (gel 60 F₂₅₄, 0,20 mm, Merck). Après élution dans les phases mobiles adéquates, leur observation est systématiquement effectuée sous lumière UV à 254 et 365 nm, avant révélation par une solution d'anisaldéhyde sulfurique (0,5 mg de méthoxybenzaldéhyde dissous dans 85 mL de méthanol et 10 mL d'acide acétique glacial, additionnée extemporanément de 2% d'acide sulfurique concentré. Chauffage à 100°C pendant 2 minutes après pulvérisation). Pour l'acide capératique, la révélation est effectuée par pulvérisation d'eau distillée ou d'une solution de bleu de bromothymol (0,04 g de bleu de bromothymol dissous dans 100 mL de soude à 0,01 mol/L).

III.2. Chromatographie liquide haute performance avec détecteur à barrette de diodes (CLHP-UVBD)

Les analyses par chromatographie liquide haute performance sont mises en œuvre sur un appareil Alliance 2690 (Waters), couplé à un détecteur à barrette de diodes (Waters 996) et en utilisant une colonne de silice greffée C18 (Hibar® LiChrospher® 100, 250 x 4 mm, 5 µm, Merck). L'élution est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites par Yoshimura en utilisant la phase mobile MeOH/H₂O/H₃PO₄ 80/20/0,9 (v/v/v) à un débit de 1 mL/min (Yoshimura *et al.*, 1994).

III.3. Chromatographie en Phase Gazeuse avec détecteur de Masse (CPG-SM)

Les analyses sont réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse Fisons Instruments (GC 8000 Series) couplé à un spectromètre de masse de la même marque modèle MD 800, fonctionnant en mode impact électronique (IE). Une colonne capillaire Optima 5 MS - 0,25 μm (30 m x 0,32 mm, Macherey Nagel) est utilisée. Des solutions à 2 mg/mL pour les composés purs et 5 mg/mL pour les bruts sont préparées puis 1 μL est injecté (soit 2 μg). La température de l'injecteur est de 270°C et celle du four suit le programme suivant : de 60°C à 300°C (10°C/minute) puis 20 minutes à 300°C.

III.4. Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les acquisitions des spectres proton et carbone 13 sont effectuées sur un spectromètre Bruker DPX, à 400 et 100 MHz respectivement, au Service Commun de Recherche et d'Analyse des Biomolécules de Limoges. Les spectres sont réalisés dans différents solvants deutérés : CDCl_3 , Acétone- d_6 , CD_3OD et $\text{DMSO}-d_6$. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par millions (ppm), par rapport au tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est indiquée comme suit : s (singulet), br s (singulet élargi), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (double doublet).

III.5. Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR)

Les spectres de masse haute résolution sont réalisés sur plusieurs types d'appareil (Ionisation ElectroSpray - IES - en mode positif ou négatif) et sur deux plateformes distinctes :

- Spectromètre Bruker MaXis UHR-QTOF à l'ICOA (Institut de Chimie Organique et Analytique) d'Orléans et au CRMPO (Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest) de Rennes.
- Spectromètres Bruker MicrOTOF-Q II et Thermo-Fischer Q-Extactive, au CRMPO de Rennes.

Les composés sont solubilisés dans le méthanol, dans l'acétone ou dans un mélange dichlorométhane/acétonitrile 95/5.

III.6. Spectrophotométrie Ultra-Violet (UV)

Les spectres UV sont enregistrés sur un spectrophotomètre UV-visible Thermo Scientific Genesis 10S. Les échantillons sont dissous dans le méthanol à la concentration de $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Soit une radiation monochromatique de longueur d'onde fixe traversant un échantillon, l'absorbance vérifie la loi de Beer-Lambert soit : $A = \log I_0/I = \epsilon l C$, avec : A : absorbance ; ϵ : coefficient d'absorption molaire ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ; l : largeur de la cuve (cm) et C : concentration de la solution ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

III.7. Spectrométrie Infra-Rouge (IR)

Les spectres infra-rouge sont réalisés sur un spectromètre à transformée de Fourier Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 1000. Les échantillons solides, disponibles en quantité suffisante, sont analysés après inclusion dans une matrice de KBr anhydre à une concentration de 0,5 %. Seule la cladoxanthone A a fait l'objet d'un dépôt liquide (dans le chloroforme).

Les fréquences d'absorption (ν) des groupements fonctionnels sont exprimées en cm^{-1} à leur maximum d'intensité.

III.8. Point de Fusion (PF)

Les points de fusion ont été mesurés en utilisant un appareil Electrothermal® 9100 à l'aide de tubes capillaires 0,8-1,10 x 90 mm.

III.9. Pouvoir Rotatoire (PR)

Le pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D$) a été déterminé sur un polarimètre Atago AP-300, à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589 nm), à la température de 24°C : $[\alpha]^{24}_D = \alpha_{D \text{ mesuré}} / (l \times C)$, avec : l : longueur de la cuve en dm et C : concentration en g/mL.

IV. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES TROIS ESPECES DE LICHEN

IV.1. Choix des espèces

IV.1.1. Récolte des lichens

Les 17 espèces de lichens ayant fait l'objet du criblage ont été récoltées par M. Millot et A. Dieu sur différents sites, en Haute-Vienne et en Corrèze, principalement aux mois de septembre et octobre 2011. Dans la Forêt des Vaseix (Verneuil sur Vienne, Haute-Vienne), deux itinéraires ont été empruntés : la Promenade de l'Etang et le Tour du Grand Bois (300-310 m d'altitude, exposition semi-ombragée dans les deux cas). Les récoltes suivantes ont été effectuées à la Lande du Cluzeau et de la Flotte (450 m d'altitude, exposition ensoleillée) (Meuzac - Château-Chervix, Haute-Vienne) et à la Lande de Frochet (320 m d'altitude, exposition ensoleillée) (Bussière-Boffy, Haute-Vienne). Enfin, les dernières excursions ont eu lieu à Saint-Merd-les-Oussines et aux Cascades du Deiro, à Soudeilles (Corrèze) (750-800 m d'altitude, exposition semi-ombragée). Parmi les espèces récoltées, trois ont été sélectionnées pour les études phytochimiques :

- *Cladonia incrassata* a été récolté dans la forêt des Vaseix (sentier de la Promenade de l'Etang) à Verneuil sur Vienne (Haute-Vienne), le 6 Septembre 2011. La récolte a été effectuée sur l'écorce d'une vieille souche de châtaignier, exposée mi-ombre. Un échantillon a été déposé dans l'herbier du laboratoire sous la référence HL L09/11-2.



- *Usnea florida* a été récolté dans une forêt semi-ombragée à Saint-Merd-les-Oussines (Corrèze), sur des branches chêne tombées au sol, le 19 Octobre 2011. Un échantillon a été déposé dans l'herbier du laboratoire sous la référence HL L10/11-31.



- *Flavoparmelia caperata* a été récolté sur des troncs d'arbre aux Cascades du Deiro, à Soudeilles (Corrèze). Un échantillon a été déposé dans l'herbier du laboratoire sous la référence HL L10/11-1. Afin d'obtenir une quantité suffisante pour l'étude phytochimique, une seconde récolte a été effectuée le 19 Mars 2014, Route des Levades, à Verneuil sur Vienne (Haute-Vienne).



IV.1.2. Identification des lichens

Etant donné les difficultés liées à l'identification des lichens, deux approches ont été mises en œuvre. Des observations macroscopiques d'une part, et des réactions thallines, d'autre part, ont été réalisées. Ces études d'identification ont également été discutées et confirmées par le Professeur Chantal Van Haluwyn et le Docteur Juliette Asta, lors du stage intitulé « approfondissement de la connaissance des lichens » qui a eu lieu fin Octobre 2011 à la Station Universitaire du Limousin (SULIM) de Meymac (Corrèze). De plus, les synonymies de chaque espèce ont été recherchées, sur les sites IndexFungorum (<http://www.indexfungorum.org/>) et Mycobank (<http://fr.mycobank.org/>) en particulier, afin d'effectuer des études bibliographiques les plus complètes possibles (Tableau 28).

Tableau 28 : Synonymies des espèces lichéniques étudiées.

Espèce	Synonymie
<i>Cladonia incrassata</i> Flörke	<i>Cladonia coccifera</i> var. <i>incrassata</i> (Flörke) ; <i>Cladonia brebissonii</i> f. <i>incrassata</i> (Flörke)
<i>Usnea florida</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	<i>Usnea barbata</i> var. <i>florida</i> (L.) Fr. ; <i>Lichen floridus</i> L. ; <i>Parmelia florida</i> (L.) Spreng. ; <i>Usnea barbata</i> subsp. <i>florida</i> (L.) Vain. ; <i>Usneomyces floridae</i> E.A. Thomas ex Cif. & Tomas.
<i>Flavoparmelia caperata</i> (L.) Hale	<i>Lichen caperatus</i> L. ; <i>Platismia caperatum</i> (L.) Hoffm. ; <i>Lobaria caperata</i> (L.) Hoffm. ; <i>Parmelia caperata</i> (L.) Ach. ; <i>Imbricaria caperata</i> (L.) DC. ; <i>Parmotrema caperata</i> (L.) ; <i>Pseudoparmelia caperata</i> (L.) Hale

IV.1.2.1. Observations à la loupe binoculaire

Les échantillons de lichen ont été examinés à l'aide d'une loupe binoculaire Leica M 80 équipée d'une caméra Leica DFC 290.

IV.1.2.2. Réactions thallines

Les réactions thallines sont des réactions colorées appliquées sur le thalle (médulle ou cortex), qui sont utilisées pour aider à la caractérisation d'espèces lichéniques. Les réactifs utilisés pour contribuer à l'identification des espèces de lichen récoltées sont les suivants : Test K = solution de KOH à 10 % dans l'eau ; Test C = solution de NaClO, eau de javel commerciale ; Test KC = solutions K et C appliquées l'une après l'autre ; Test Pd = 1 % de *p*-phénylène-diamine dans une solution de thiosulfate de sodium aqueuse (10 %).

Pour l'ajout de chaque réactif, un + suivi de la couleur observée est noté si la réaction est positive, et un - est noté si aucune couleur n'est apparue (réaction négative). Par exemple, K+ jaune ou K-. L'apparition de la couleur est due à la présence de composés chimiques majoritaires dans le lichen, l'intensité de la couleur étant corrélée à la quantité du ou des composé(s) ayant réagi.

Parallèlement à ces réactions, les lichens ont été observés sous lumière UV (254 nm). Selon les composés majoritairement présents, la présence ou l'absence d'une fluorescence blanche peuvent être notées (UV+ blanc ou UV-).

IV.2. Choix du solvant et du type d'extraction

Le jour de leur récolte, les lichens ont été soigneusement triés pour enlever les débris végétaux, mousses et autres éléments indésirables afin d'éviter toute contamination lors des extractions. Ils ont ensuite été séchés à température ambiante pendant quelques jours.

IV.2.1. Extractions classiques

Les essais ont été réalisés sur deux espèces récoltées en quantité, *Cladonia portentosa* et *Cladonia rangiformis*. Environ 500 mg de lichen sont broyés et extraits par 10 mL d'acétone, de chloroforme ou d'éther diéthylique pendant 2 heures, à température ambiante et sous agitation magnétique. Après filtration sur papier, les filtrats ont été évaporés à sec pour être pesés et analysés par chromatographie sur couche mince.

IV.2.2. Extractions séquentielles

Elles ont été effectuées sur des lichens récoltés en quantité suffisante : *Cladonia portentosa* et *Flavoparmelia caperata*. Environ 8 g de lichen ont été broyés puis extraits successivement par le *n*-hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, le méthanol à température ambiante et par l'eau à 60°C. Pour chaque extraction pendant 15 minutes sous agitation, 100 mL de solvant ont été utilisés. L'opération a été renouvelée jusqu'à obtention d'un filtrat incolore (3 ou 4 fois de suite) (Figure 193).

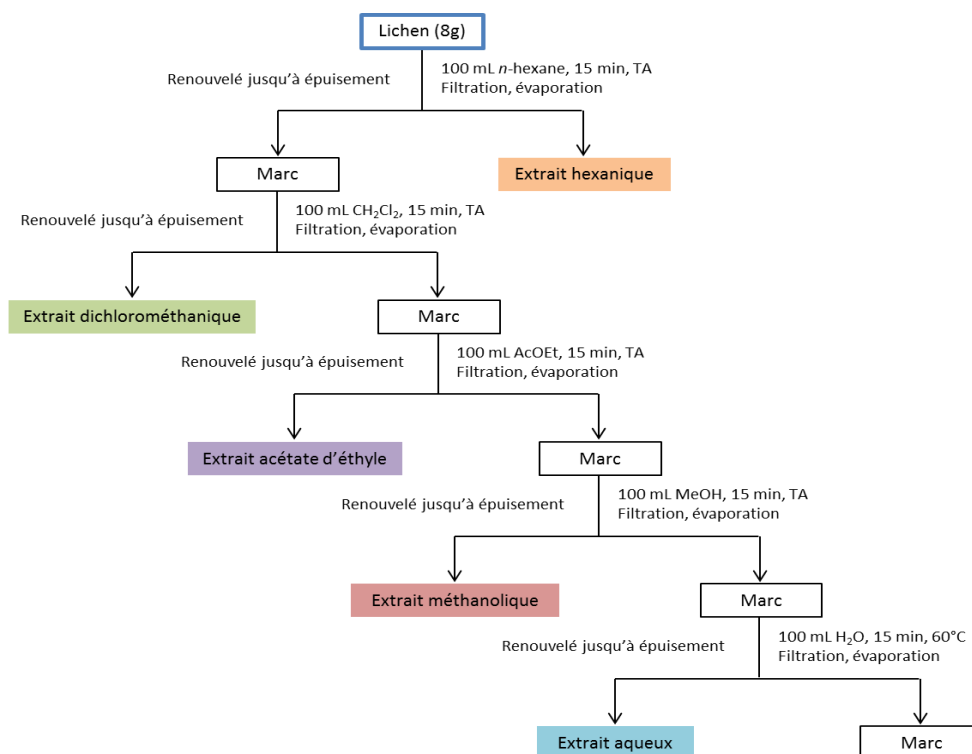


Figure 193 : Extractions séquentielles effectuées sur *Cladonia portentosa* et *Flavoparmelia caperata*.

En parallèle, des extractions classiques par l'acétone ont été effectuées sur chaque lichen (8 g) avec 100 mL de solvant, pendant 15 min et à température ambiante (opération renouvelée jusqu'à obtention d'un filtrat incolore). Après filtration, les filtrats ont été évaporés à sec puis les pourcentages d'extraction ainsi que les profils chimiques des différents extraits obtenus ont été comparés.

IV.2.3. Extractions par l'acétone sur les 17 espèces récoltées

Pour chaque espèce, 500 mg de lichen sec ont été broyés puis extraits par 10 mL d'acétone pendant 2 heures, à température ambiante et sous agitation magnétique. Après filtration, les filtrats ont été évaporés à sec puis les pourcentages d'extraction obtenus et les profils chimiques ont été comparés.

IV.3. Préparation et analyse des extraits acétoniques

IV.3.1. Protocole d'extraction

Une fois les espèces sélectionnées, les extractions par l'acétone, à température ambiante et pendant 3 heures, ont été effectuées sur 20 g de lichen sec broyé pour *C. incrassata*, 100 g pour *U. florida* et 42 g pour *F. caperata* (rapport masse lichen sec/volume solvant = 5 %). Dans les trois cas, l'opération a été renouvelée jusqu'à obtention d'un filtrat incolore (Tableau 29).

Tableau 29 : Conditions de l'extraction par l'acétone pour les trois espèces étudiées.

Espèce	<i>C. incrassata</i>	<i>U. florida</i>	<i>F. caperata</i>
Masse sèche (g)	20	100	42
Volume de solvant (mL)	400	2000	800
Nombre de répétitions	5	4	4

Après filtration, les filtrats ont été évaporés à sec puis pesés et analysés (CCM, CLHP-UVBD).

IV.3.2. Analyse des extraits par CCM et CLHP-UVBD

Dans les deux cas, l'acide (+)-usnique commercial, ainsi que les acides thamnolique, squamatique et salazinique, extraits et disponibles au laboratoire, ont été utilisés comme témoins.

Pour l'analyse par CCM, les extraits ont été repris dans l'acétone pour atteindre une concentration de 1 mg/mL et 20 μ L ont été déposés sur la plaque, développée dans l'éluant toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5 (v/v/v). Les chromatogrammes ont ensuite été observés sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélés par une solution d'ANS.

Pour l'analyse par CLHP-UVBD, les extraits ont été repris dans l'acétone pour atteindre une concentration de 1 mg/mL, puis 10 μ L ont été injectés (soit 10 μ g). La longueur d'onde suivie est 254 nm et seuls les composés ayant un λ_{max} supérieur de 200 nm ont été pris en compte. En outre, ce type d'analyse est non exhaustif car il permet de détecter uniquement les composés aromatiques.

IV.3.3. Dosage de l'acide usnique dans les extraits par CLHP-UVBD

Une gamme d'acide usnique a été préparée après solubilisation dans l'acétone afin d'obtenir des solutions de concentrations comprises entre 0,15 et 2,5 mg/mL. Des triplicats ont été réalisés et 10 μ L ont été injectés (soit entre 1,5 et 25 μ g) (Figure 194).

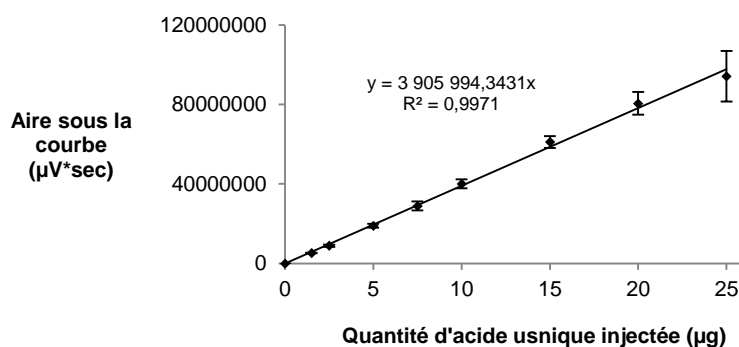


Figure 194 : Droite étalon obtenue pour le dosage de l'acide usnique.

Les trois extraits acétoniques ont été solubilisés dans l'acétone pour atteindre une concentration de 1 mg/mL, puis 10 µL ont été injectés (soit 10 µg) (analyses effectuées en triplicat). Le pourcentage massique d'acide didymique a ensuite été déterminé en tenant compte de l'équation de la droite ainsi que de l'aire sous la courbe obtenue.

IV.3.4. Dosage de l'acide didymique dans l'extrait de *C. incrassata*

Une gamme étalon d'acide didymique a été préparée après solubilisation dans l'acétone afin d'obtenir des solutions de concentrations comprises entre 0,15 et 2,5 mg/mL. Des triplicats ont été réalisés et 10 µL ont été injectés (soit entre 1,5 et 25 µg) (Figure 195).

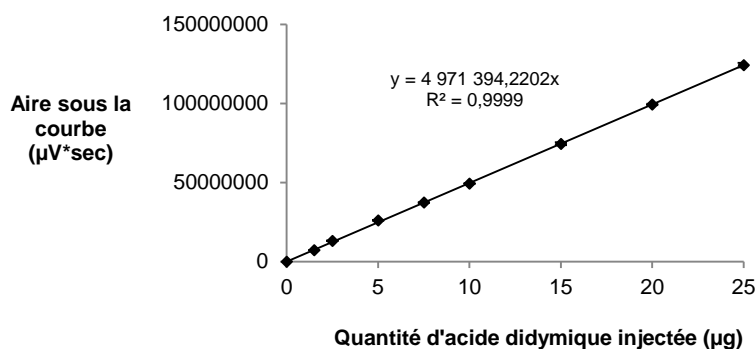


Figure 195 : Droite étalon obtenue pour le dosage de l'acide didymique.

L'extrait acétonique de *C. incrassata* est repris dans l'acétone pour atteindre une concentration de 1 mg/mL, puis 10 µL sont injectés (soit 10 µg) (analyse effectuée en triplicat). Le pourcentage massique d'acide didymique est ensuite déterminé en tenant compte de l'équation de la droite ainsi que de l'aire sous la courbe obtenue.

IV.4. Fractionnement bioguidé des extraits

IV.4.1. Purification de l'extrait de *C. incrassata* Flörke

L'extraction de 20 g de lichen par l'acétone à température ambiante a conduit à l'obtention de 1,49 g d'extrait nommé CiA. La reprise de l'extrait brut sec par 30 mL d'acétone a entraîné la formation d'un précipité (CiP). Après centrifugation (2500 rpm, 10 minutes), ce dernier a été obtenu avec une masse de 790 mg et le surnageant avec une masse de 700 mg (CiS).

Le précipité CiP a été repris par 50 mL de dichlorométhane ce qui a conduit à l'obtention d'un précipité CiP2 (750 mg) et d'un surnageant CiS2 (40 mg). Le précipité CiP2 est repris par de l'acétate d'éthyle à chaud (2 x 30 mL, 85°C). Après centrifugation (2500 rpm, 5 minutes), un surnageant et un précipité, correspondant au composé **Ci8** (585 mg) sont obtenus. Après évaporation à sec, le résidu du surnageant CiS2 a été repris par 2 mL de dichlorométhane. Un précipité a été obtenu (20 mg) dont 20 mg ont ensuite été traités sur colonne sur gel de Sephadex® LH-20 (hauteur de gel de 16 cm et diamètre de 2 cm) avec un gradient tétrahydrofurane/méthanol 2/1 jusqu'à méthanol/eau 2/1. Le composé **Ci7** (5 mg) a été obtenu sous forme d'une poudre rouge.

Le surnageant CiS a été purifié par CLMP en phase inverse (hauteur de gel de 50 cm et diamètre de 2 cm) avec un gradient méthanol/eau 50/50 (275 mL), 60/40 (230 mL), 70/30 (145 mL), 80/20 (610 mL), 90/10 (335 mL), 100/0 (350 mL) pour finir par un mélange méthanol/dichlorométhane 80/20 (100 mL), à un débit de 2,5 mL/minute. A l'issue de la purification, 409 fractions de 5 mL ont été obtenues et leur réunion selon leurs profils CCM a conduit à l'obtention de 18 fractions CiS1 à CiS18. Les produits **Ci1** (6 mg), **Ci2** (62 mg), **Ci3** (14 mg) et **Ci5** (3 mg) sont obtenus purs directement en sortie de colonne.

Purification de la fraction CiS2 : 16 mg sont séparés par CCM préparative dans l'éluant toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5 (v/v/v) pour obtenir 3 mg du composé **Ci4**.

Purification de la fraction CiS18 : 18 mg sont chromatographiés par CCM préparative dans l'éluant toluène/chloroforme/méthanol 80/20/2 (v/v/v) pour obtenir 2 mg de produit **Ci6**.

IV.4.2. Purification de l'extrait d'*Usnea florida* (L.) Weber ex F.H. Wigg.

L'extraction de 100 g de lichen par l'acétone à température ambiante a conduit à l'obtention de 2,46 g d'extrait (UfA). La reprise de l'extrait brut par 50 mL d'acétone a entraîné la formation de 1,27 g d'un précipité (UfP). Ce dernier a été repris par 100 mL de dichlorométhane ce qui a conduit à la formation d'un précipité (composé **Uf2**, 750 mg) et d'un surnageant (composé **Uf1**, 518 mg).

Le résidu après évaporation du surnageant (1,19 g) a été repris par 100 mL de cyclohexane entraînant la formation d'un précipité (720 mg). Ce dernier a été repris par 30 mL de chloroforme pour former un précipité et un surnageant (UfS).

Purification du surnageant UfS : la reprise du résidu après évaporation du surnageant (520 mg) par 10 mL de méthanol a conduit à l'obtention d'un précipité et d'un surnageant (205 mg). Celui-ci a été purifié par CLMP en phase inverse (hauteur de gel de 50 cm et diamètre de 2 cm) avec un gradient méthanol/eau 50/50 (187,5 mL), 60/40 (142,5 mL), 70/30 (302,5 mL), 80/20 (102,5 mL), 90/10 (145 mL), 100/0 (180 mL) pour finir par un mélange méthanol/dichlorométhane 80/20 (175 mL), à un débit de 2,5 mL/minute. A l'issue de la purification, 500 fractions de 2,5 mL ont été obtenues et leur réunion selon leurs profils CCM a conduit à l'obtention de 17 fractions UfS1 à UfS17.

Purification de la fraction UfS7 : la fraction (30 mg) a été purifiée par CCM préparative dans cyclohexane/acétate d'éthyle 50/50 pour obtenir le composé **Uf3** (4 mg) accompagné de trois autres sous-fractions. L'une d'elle (18 mg) a été chromatographiée par CCM préparative dans hexane/éther éthylique/acide formique 140/80/10 (v/v/v) pour obtenir le composé **Uf6** (1,6 mg).

Purification de la fraction UfS8 : la fraction (18 mg) a été purifiée par CCM préparative dans toluène/acétate d'éthyle/ acide formique 70/20/5 (v/v/v) pour obtenir **Uf4** (1,1 mg) et **Uf5** (2 mg).

IV.4.3. Purification de l'extrait de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale

L'extraction de 42 g de lichen par l'acétone à température ambiante a conduit à l'obtention de 3,44 g d'extrait nommé FcA. La reprise de l'extrait brut sec par 70 mL d'acétone a entraîné la formation d'un précipité (FcP) avec une masse de 2,38 g et d'un surnageant FcS. Le précipité FcP a été repris par 30 mL de dichlorométhane ce qui a conduit à la formation d'un nouveau précipité (composé **Fc2**, 1380 mg) et d'un surnageant (composé **Fc1**, 290 mg).

Le résidu après évaporation du surnageant FcS (1,06 g) a été purifié par CLMP en phase inverse (hauteur de gel de 50 cm et diamètre de 2 cm) avec un gradient méthanol/eau 50/50 (237,5 mL), 60/40 (332,5 mL), 70/30 (200 mL), 80/20 (121 mL), 90/10 (141 mL), 100/0 (237,5 mL) à un débit de 2,5 mL/minute. A l'issue de la purification, 665 fractions de 2,5 mL ont été obtenues et leur réunion selon leurs profils CCM a conduit à l'obtention de 13 fractions FcS1 à FcS13.

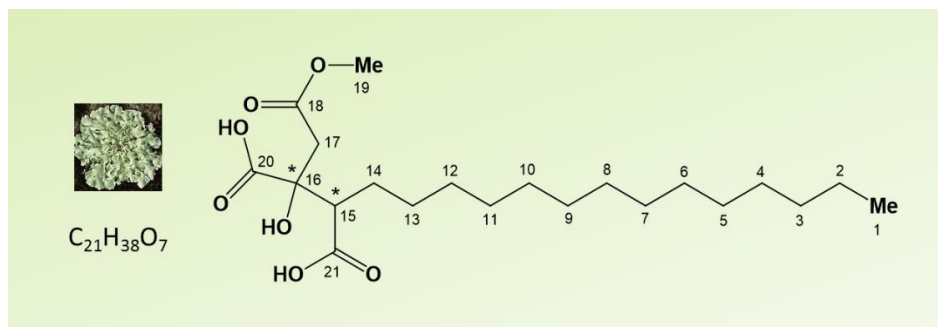
Purification de la fraction FcS6 : la fraction (171 mg) a été purifiée par gel de Sephadex® LH-20 (hauteur de gel de 31 cm et diamètre de 2,5 cm) dans le méthanol pour obtenir 5 sous-fractions dont une correspond au composé **Fc3** (82 mg).

Purification de la fraction FcS11 : la fraction (120 mg) a été purifiée par CLMP en phase normale (hauteur de gel de 45 cm et diamètre de 2 cm) avec un gradient *n*-hexane/acétate d'éthyle 70/30 (128,75 mL), 50/50 (28,75 mL), 40/60 (38,75 mL) à un débit de 2,5 mL/minute. A l'issue de la purification, 120 fractions ont été obtenues et leur réunion selon leurs profils CCM a conduit à l'obtention de 7 fractions dont une correspond au composé **Fc4** (17 mg).

IV.5. Description des produits isolés

Les fractionnements bioguidés mis en œuvre au cours de ce travail, à partir de trois espèces de lichen, ont permis d'isoler un certain nombre de métabolites. Les caractéristiques analytiques de ces composés, classés par ordre alphabétique, sont détaillées ci-après. Chaque description est accompagnée d'une illustration indiquant à partir de quelle espèce de lichen le composé a été isolé.

- **Acide capératique (Fc3) :**



Aspect : poudre blanche

CCM : $R_f = 0,15$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

$R_f = 0,10$ (chloroforme/méthanol 80/20)

$R_f = 0,40$ (toluène/acide acétique 10/4)

Révélation au bleu de bromothymol ou à l'eau distillée

Pouvoir rotatoire (MeOH) : $[\alpha]_D^{27} = -100,1$ (deux carbones asymétriques notés *)

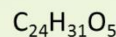
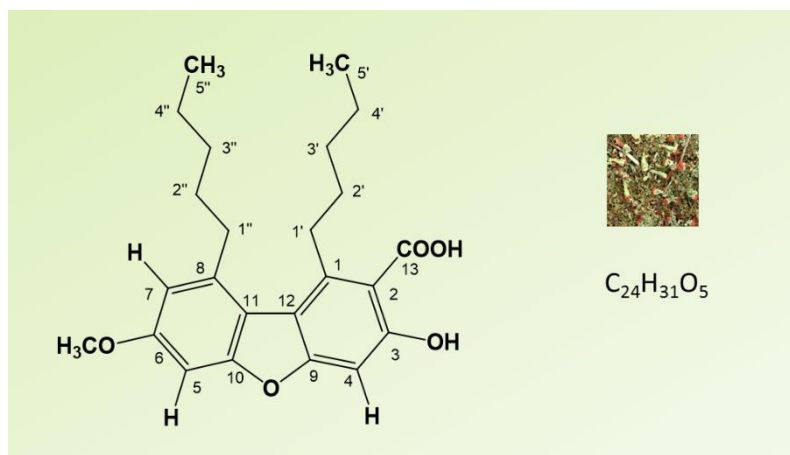
Point de fusion : 129,3°C

SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^- = 403,2690$; masse mesurée m/z $[M-H]^- = 403,2692$

RMN 1H (400 MHz, CD_3OD) : 3,64 (s, 3H, OCH_3 -19) ; 3,09 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz ; H-17) ; 2,72 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz ; H-17) ; 2,66 (dd, 1H, $J = 2,8$ et 11,7 Hz ; H-15) ; 1,84-1,76 (m, 1H, H-14) ; 1,49-1,45 (m, 1H, H-13) ; 1,32-1,28 (m, 27 H) ; 0,89 (t, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -1).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) : 176,5 (C-20) ; 176,3 (C-21) ; 172,4 (C-18) ; 77,0 (C-16) ; 54,9 (C-15) ; 52,2 (C-19) ; 42,6 (C-17) ; 33,1 (C-2) ; 30,8-30,5 (C-4 à C-12) ; 28,9 (C-13) ; 28,2 (C-14) ; 23,8 (C-3) ; 14,5 (C-1).

• **Acide condidymique (Ci3) :**



Aspect : cristaux blancs

CCM : $R_f = 0,65$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

$R_f = 0,71$ (toluène/chloroforme/acétone/méthanol/acide formique 80/20/40/2/5)

Coloration mauve à l'ANS

Point de fusion : 155°C

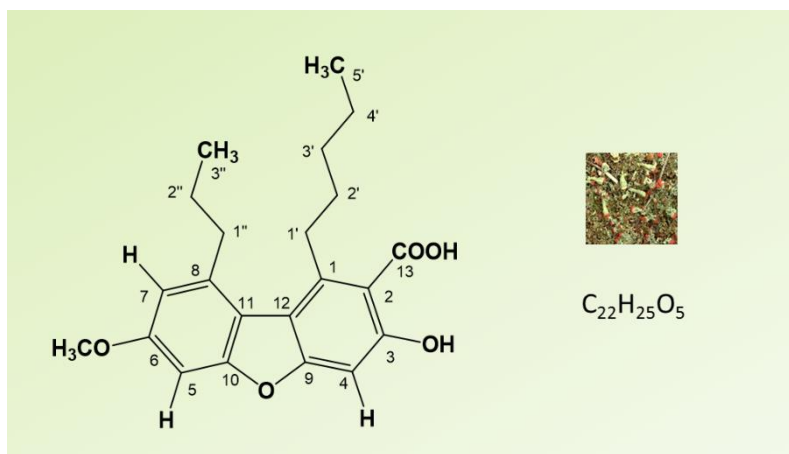
SMHR-IES : masse attendue m/z $[\text{M}-\text{H}]^- = 397,2020$; masse mesurée m/z $[\text{M}-\text{H}]^- = 397,2020$

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 229 (4,29) 241 (4,31) 307 (3,99) nm

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : 11,10 (br s, 1H, OH-3) ; 6,95 (s, 1H, H-4) ; 6,90 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz ; H-5) ; 6,77 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz ; H-7) ; 3,88 (s, 3H, OCH_3 -6) ; 3,53 (br t, 2H, $J = 7,9$ Hz ; CH_2 -1') ; 3,04 (br t, 2H, $J = 7,9$ Hz ; CH_2 -1'') ; 1,68 (m, 2H, CH_2 -2'') ; 1,60 (m, 2H, CH_2 -2') ; 1,39-1,30 (m, 8H, CH_2 -3', CH_2 -3'', CH_2 -4', CH_2 -4'') ; 0,91 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz ; CH_3 -5'') ; 0,86 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz ; CH_3 -5').

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : 175,9 (C-13) ; 162,1 (C-9) ; 160,7 (C-3) ; 158,8 (C-10) ; 158,7 (C-6) ; 143,0 (C-1) ; 138,4 (C-8) ; 119,4 (C-12) ; 115,7 (C-11) ; 113,5 (CH-7) ; 107,5 (C-2) ; 97,6 (CH-4) ; 94,1 (CH-5) ; 55,6 (OCH_3 -6) ; 37,3 (CH_2 -1'') ; 33,4 (CH_2 -1') ; 32,4 (CH_2 -2') ; 31,7 (CH_2 -3') ; 31,6 (CH_2 -2'') ; 31,3 (CH_2 -3'') ; 22,6 (CH_2 -4'') ; 22,7 (CH_2 -4') ; 14,0 (CH_3 -5', CH_3 -5'').

• **Acide didymique (Ci2) :**



Aspect : cristaux blancs

CCM : $R_f = 0,64$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

$R_f = 0,69$ (toluène/chloroforme/acétone/méthanol/acide formique 80/20/40/2/5)

Coloration mauve à l'ANS

Point de fusion : 171,6°C

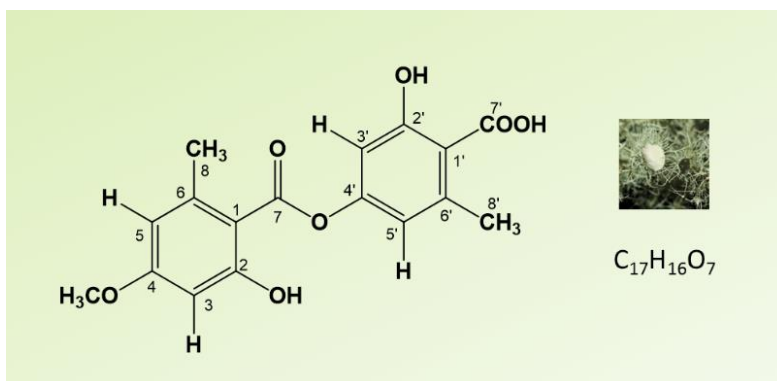
SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^- = 369,1707$; masse mesurée m/z $[M-H]^- = 369,1705$

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 229 (4,45) 241 (4,47) 307 (4,19) nm

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 10,97 (br s, 1H, OH-3) ; 6,96 (s, 1H, H-4) ; 6,91 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz ; H-5) ; 6,78 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz ; H-7) ; 3,87 (s, 3H, OCH₃-6) ; 3,55 (br t, 2H, $J = 7,9$ Hz ; CH₂-1') ; 3,04 (br t, 2H, $J = 7,9$ Hz ; CH₂-1'') ; 1,72 (sextet, 2H, $J = 7,5$ Hz ; CH₂-2'') ; 1,60 (m, 2H, CH₂-2') ; 1,39 (m, 2H, CH₂-3') ; 1,33 (m, 2H, CH₂-4') ; 1,02 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz ; CH₃-3'') ; 0,87 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz ; CH₃-5').

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 175,9 (C-13) ; 162,1 (C-9) ; 160,7 (C-3) ; 158,8 (C-10) ; 158,7 (C-6) ; 143,3 (C-1) ; 138,4 (C-8) ; 119,4 (C-12) ; 115,7 (C-11) ; 113,6 (CH-7) ; 107,5 (C-2) ; 97,7 (CH-4) ; 94,2 (CH-5) ; 55,6 (OCH₃-6) ; 39,3 (CH₂-1'') ; 33,3 (CH₂-1') ; 32,3 (CH₂-2') ; 31,6 (CH₂-3') ; 22,6 (CH₂-4') ; 24,7 (CH₂-2'') ; 13,8 (CH₃-3'') ; 14,0 (CH₃-5').

• **Acide évernique (Uf4) :**



CCM : $R_f = 0,65$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

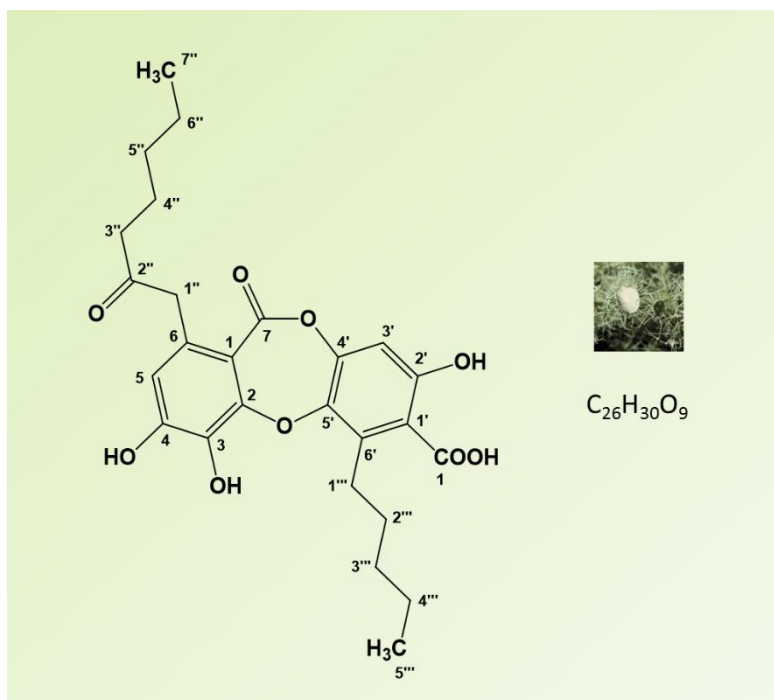
Coloration rougeâtre à l'ANS

SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^- = 331,0823$; masse mesurée m/z $[M-H]^- = 331,0825$

RMN ¹H (400 MHz, acétone-d₆) : 11,18 (br s, 1H, OH-2) ; 6,79 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz ; H-3') ; 6,75 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz ; H-5') ; 6,46 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz ; H-5) ; 6,40 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz ; H-3) ; 3,87 (s, 3H, OCH₃-4) ; 2,63 (s, 3H, CH₃-6) ; 2,64 (s, 3H, CH₃-8').

RMN ¹³C (100 MHz, acétone-d₆) : 170,6 (COOH-1') ; 170,4 (C-7) ; 166,8 (C-2) ; 165,8 (C-4) ; 165,6 (C-2') ; 154,9 (C-4') ; 144,6 (C-6') ; 144,3 (C-6) ; 117,2 (C-5') ; 112,2 (C-5) ; 112,0 (C-1') ; 109,4 (C-3') ; 105,6 (C-1) ; 99,8 (C-3) ; 56,0 (OCH₃-4) ; 24,3 (CH₃-8) ; 24,0 (CH₃-6').

• **Acide 3-hydroxyphysodique (= acide oxyphysodique) (Uf6) :**



CCM : $R_f = 0,40$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

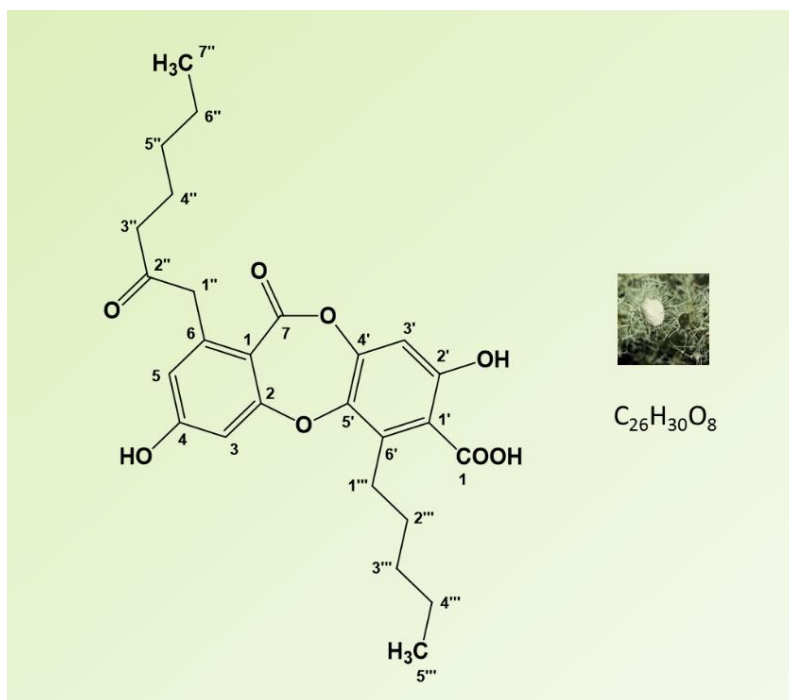
$R_f = 0,28$ (hexane/éther diéthylique/acide formique 130/80/20)

Coloration orange à l'ANS

SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^- = 485,1817$; masse mesurée m/z $[M-H]^- = 485,1818$

RMN 1H (400 MHz, CD_3OD) : 6,52 (d, 1H, $J = 2$ Hz ; H-5) ; 6,49 (s, 1H, H-3') ; 3,81 (s, 2H, CH_2-1'') ; 3,57 (m, 2H, CH_2-1''') ; 2,50 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz ; CH_2-3'') ; 1,60-1,23 (m, 12H, CH_2-4'' , CH_2-5'' , CH_2-6'' , CH_2-2''' , CH_2-3''' , CH_2-4''') ; 0,90 (2 x t, 6H, $J = 6,8$ Hz ; CH_3-7'' , CH_3-5''').

• **Acide physodique (Uf5) :**



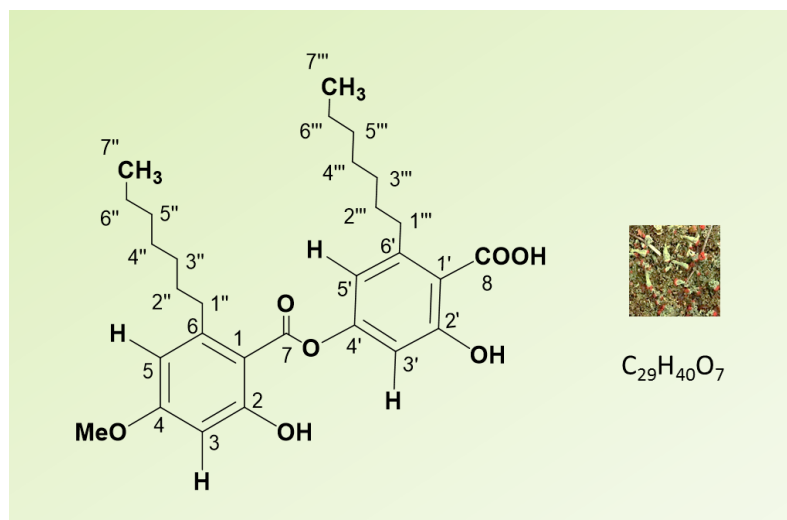
CCM : $R_f = 0,52$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

Coloration orange à l'ANS

SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^- = 469,1868$; masse mesurée m/z $[M-H]^- = 469,1869$

RMN ¹H (400 MHz, acétone-d₆) : 6,80 (d, 1H, $J = 2$ Hz ; H-3) ; 6,62 (d, 1H, $J = 2$ Hz ; H-5) ; 6,48 (s, 1H, H-3') ; 3,97 (s, 2H, CH₂-1'') ; 3,44 (m, 2H, CH₂-1''') ; 2,51 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz ; CH₂-3'') ; 1,60 (m, 2H, CH₂-4''') ; 1,55 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz ; CH₂-4'') ; 1,45 (m, 2H, CH₂-6'') ; 1,38-1,29 (m, 6H, CH₂-5'', CH₂-2''', CH₂-3''') ; 0,88 (2 x t, 6H, $J = 6,8$ Hz ; CH₃-7'', CH₃-5''').

• **Acide prasinique (Ci5) :**



CCM : $R_f = 0,75$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

$R_f = 0,71$ (toluène/chloroforme/acétone/méthanol/acide formique 80/20/40/2/5)

Coloration orange à l'ANS

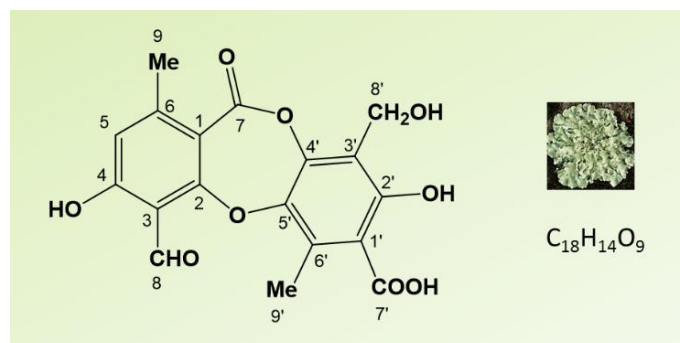
SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^- = 499,2701$; masse mesurée m/z $[M-H]^- = 499,2697$

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 217 (4,31) 256 (3,99) 300 (3,62) nm

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : 11,32 (s, 1H, OH-2') ; 6,68 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz ; H-5) ; 6,55 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz ; H-3) ; 6,32 (dd, 1H, $J = 2,4$ et 7,8 Hz ; H-5') ; 6,34 (dd, 1H, $J = 2,4$ et 7,8 Hz ; H-3') ; 3,83 (s, 3H, OCH₃-4) ; 2,84 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz ; CH₂-1''') ; 2,80 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz ; CH₂-1'') ; 1,62 (m, 2H, CH₂-2'') ; 1,51 (m, 2H, CH₂-2''') ; 1,26 (s, 4H, CH₂-6'', CH₂-6''') ; 1,35-1,27 (m, 12H, CH₂-3'', CH₂-3''', CH₂-4'', CH₂-4''', CH₂-5'', CH₂-5''') ; 0,87 (m, 3H, CH₃-7''') ; 0,88 (m, 3H, CH₃-7'').

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : 174,7 (C-8) ; 171,3 (C-7) ; 166,2 (C-2') ; 162,7 (C-4') ; 162,4 (C-4) ; 154,2 (C-2) ; 150,5 (C-6') ; 146,3 (C-6) ; 116,4 (C-1) ; 112,8 (CH-5) ; 111,3 (CH-5') ; 105,0 (CH-3) ; 104,8 (C-1') ; 102,8 (CH-3') ; 55,6 (OCH₃-4) ; 36,7 (CH₂-1''') ; 34,1 (CH₂-1'') ; 31,82 (CH₂-5'') ; 31,77 (CH₂-5''') ; 31,5 (CH₂-2'') ; 31,4 (CH₂-2''') ; 29,8 (CH₂-4''') ; 29,5 (CH₂-4'') ; 29,09 (CH₂-3'') ; 29,05 (CH₂-3''') ; 22,67 (CH₂-6'') ; 22,65 (CH₂-6''') ; 14,10 (CH₃-7''') ; 14,09 (CH₃-7'').

- **Acide protocétrarique (Fc2) :**



Aspect : poudre blanche

CCM : $R_f = 0,24$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

$R_f = 0,45$ (toluène/chloroforme/acétone/méthanol/acide formique 80/20/40/2/5)

Coloration bleue-grise à l'ANS

Point de fusion : 227°C

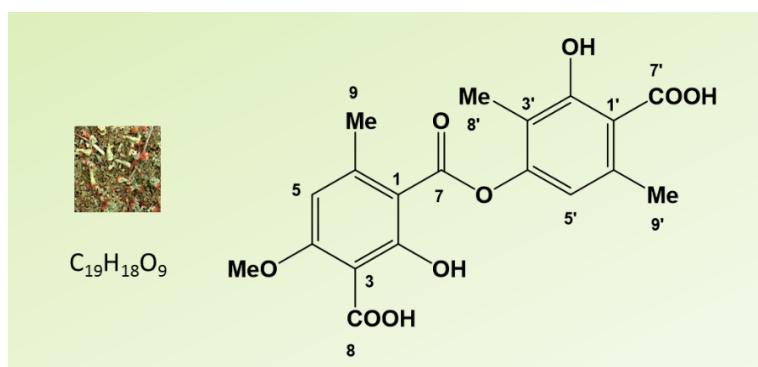
SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^- = 373,0565$; masse mesurée m/z $[M-H]^- = 373,0565$

UV (analyse CLHP-UVBD) λ_{max} : 212, 241, 318 nm

RMN 1H (400 MHz, DMSO-d₆) : 11,94 (s, 1H, OH-2') ; 10,59 (s, 1H, CHO-8) ; 6,84 (s, 1H, H-5) ; 4,61 (s, 2H, CH₂OH-8') ; 2,43 (s, 3H, CH₃-9) ; 2,39 (s, 3H, CH₃-9').

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d₆) : 191,6 (CHO-8) ; 170,0 (COOH-7') ; 163,8 (C-2) ; 163,7 (C-4) ; 161,1 (C-7) ; 154,4 (C-2') ; 151,9 (C-6) ; 144,4 (C-4') ; 141,7 (C-5') ; 129,2 (C-6') ; 118,6 (C-3') ; 116,9 (C-5) ; 116,6 (C-1') ; 112,3 (C-1) ; 111,7 (C-3) ; 52,7 (CH₂OH-8') ; 21,3 (CH₃-9) ; 14,3 ppm (CH₃-9').

- **Acide squamatique (CiP) :**



Aspect : poudre beige

CCM : $R_f = 0,37$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

$R_f = 0,26$ (hexane/éther diéthylique/acide formique 130/80/20)

$R_f = 0,55$ (toluène/chloroforme/acétone/méthanol/acide formique 80/20/40/2/5)

Coloration orange à l'ANS

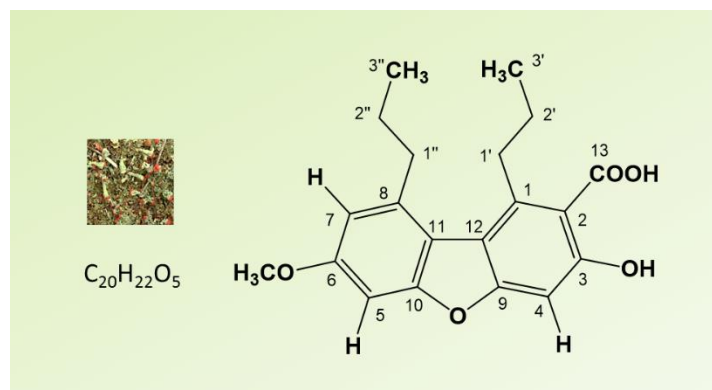
Point de fusion : 220°C

UV (analyse CLHP-UVBD) λ_{max} : 216, 249, 311 nm

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : 13,44 (br s, 1H, OH-2 ou OH-2') ; 12,30 (br s, 1H, OH-2 ou OH-2') ; 6,67 (s, 1H, H-5') ; 6,65 (s, 1H, H-5) ; 3,88 (s, 3H, OCH₃-4) ; 2,50 (m, 6H, CH₃-9, CH₃-9') ; 2,05 (s, 3H, CH₃-8').

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : 173,2 (COOH-7') ; 170,1 (COOH-8) ; 165,6 (C-7) ; 161,3 (C-2') ; 160,8 (C-4) ; 160,0 (C-2) ; 152,0 (C-4') ; 143,9 (C-6) ; 139,0 (C-6') ; 116,0 (C-3' ou C-5') ; 115,9 (C-3' ou C-5') ; 111,9 (C-1' ou C-1) ; 111,4 (C-1' ou C-1) ; 105,5 (C-5) ; 104,5 (C-3) ; 56,3 (OMe-4) ; 22,8 (CH₃-9') ; 21,2 (CH₃-9) ; 9,1 (CH₃-8').

• **Acide subdidymique (Ci1) :**



Aspect : poudre beige

CCM : $R_f = 0,53$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

Coloration mauve à l'ANS

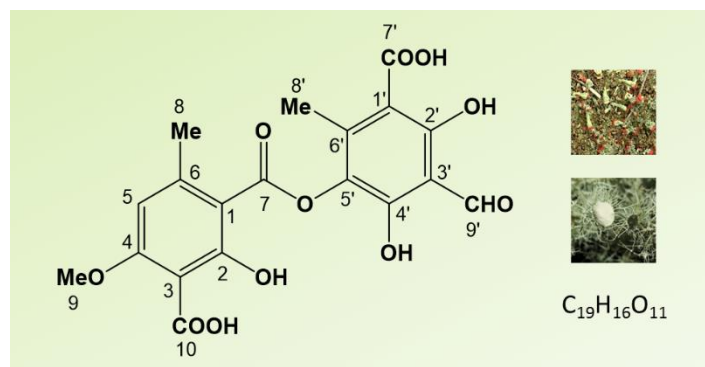
SMHR-IES : masse attendue m/z $[M+H]^+ = 343,1540$; masse mesurée m/z $[M+H]^+ = 343,1544$

UV (analyse CLHP-UVBD) λ_{max} : 229, 241, 307 nm

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) : 6,95 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz ; H-5) ; 6,86 (s, 1H, H-4) ; 6,76 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz ; H-7) ; 3,86 (s, 3H, OCH₃-6) ; 3,15 (m, 2H, CH₂-1') ; 3,01 (m, 2H, CH₂-1'') ; 1,67 (m, 4H, CH₂-2', CH₂-2'') ; 1,02 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz ; CH₃-3'') ; 1,00 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz ; CH₃-3').

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) : 174,0 (C-13) ; 160,2 (C-6) ; 159,9 (C-10) ; 159,7 (C-9) ; 156,5 (C-3) ; 139,1 (C-8) ; 137,6 (C-1) ; 119,3 (C-2) ; 117,5 (C-12) ; 117,1 (C-11) ; 114,4 (CH-7) ; 97,0 (CH-4) ; 95,1 (CH-5) ; 56,2 (OCH₃-6) ; 39,7 (CH₂-1'') ; 35,9 (CH₂-1') ; 26,5 (CH₂-2') ; 26,4 (CH₂-2'') ; 14,1 (CH₃-3', CH₃-3'').

• **Acide thamnolique (CiP, Uf2) :**



Aspect : poudre blanc cassé

CCM : $R_f = 0,35$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

$R_f = 0,51$ (toluène/chloroforme/acétone/méthanol/acide formique 80/20/40/2/5)

Coloration orange à l'ANS

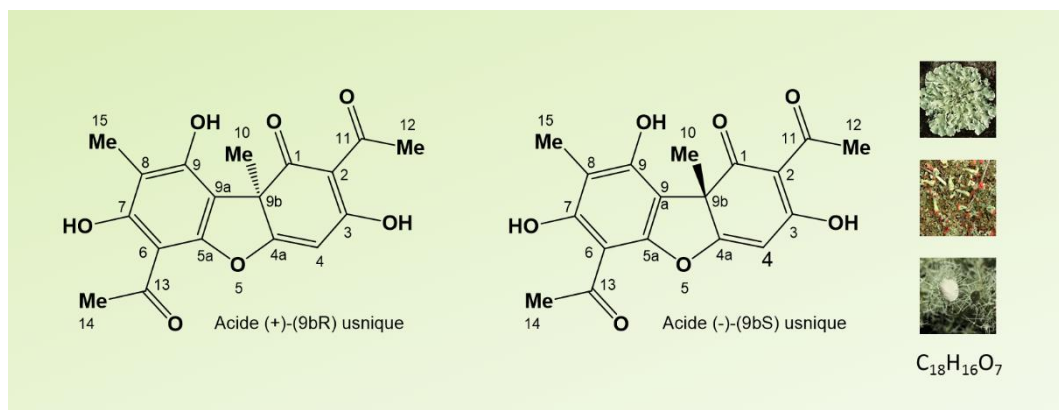
Point de fusion : 218°C

SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^- = 419,0620$; masse mesurée m/z $[M-H]^- = 419,0620$

UV (analyse CLJHP-UVBD) λ_{max} : 287, 316, 352 nm

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) : 12,23 ppm (br s, 2H, OH-2, OH-2') ; 10,27 ppm (s, 1H, CHO-9') ; 6,63 ppm (s, 1H, H-5) ; 3,88 ppm (s, 3H, OCH₃-9) ; 2,50 ppm (s, 3H, CH₃-8) ; 2,45 ppm (s, 3H, CH₃-8').

• **Acides (+) et (-)-usnique (Ci4, Uf1, Fc1) :**



Aspect : aiguilles jaunes

CCM : $R_f = 0,77$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

$R_f = 0,94$ (toluène/chloroforme/acétone/méthanol/acide formique 80/20/40/2/5)

$R_f = 0,56$ (hexane/éther diéthylique/acide formique 130/80/20)

Coloration rose à l'ANS

Pouvoir rotatoire ($CHCl_3$) : $[\alpha]_D^{24} = -443$ pour l'acide (-)-usnique isolé de *C. incrassata*

$[\alpha]_D^{24} = +460$ pour l'acide (+)-usnique isolé d'*U. florida*

$[\alpha]_D^{24} = +520$ pour l'acide (+)-usnique isolé de *F. caperata*

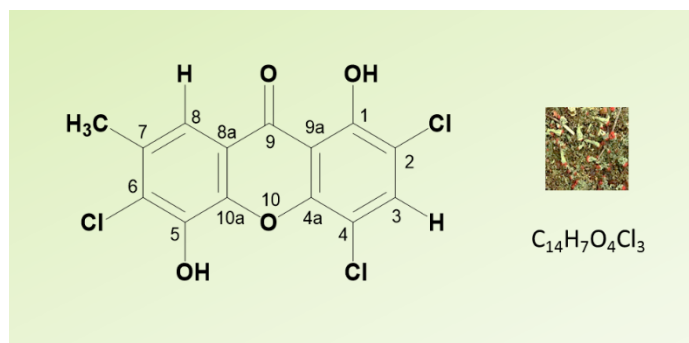
Point de fusion : 200°C

SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^- = 343,0823$; masse mesurée m/z $[M-H]^- = 343,0824$

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 232 (4,50) 282 (4,43) nm

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : 18,83 (s, 1H, OH-3) ; 13,31 (s, 1H, OH-7) ; 11,03 (s, 1H, OH-9) ; 5,98 (s, 1H, H-4) ; 2,68 (s, 3H, CH_3 -14) ; 2,67 (s, 3H, CH_3 -12) ; 2,11 (s, 3H, CH_3 -15) ; 1,76 (s, 3H, CH_3 -10).

- **Cladoxanthone A (Ci6) :**



Aspect : poudre jaune

CCM : $R_f = 0,87$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

$R_f = 0,90$ (toluène/chloroforme/acétone/méthanol/acide formique 80/20/40/2/5)

Coloration jaune pâle à l'ANS

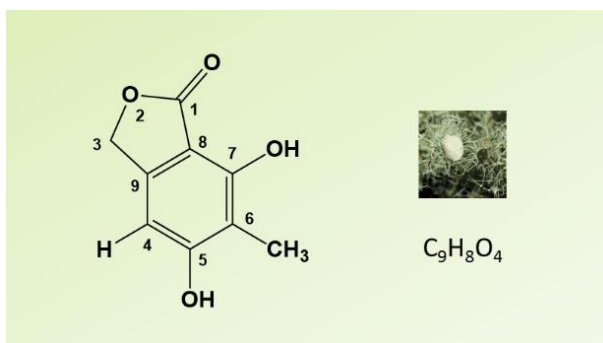
SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^- = 342,9337$; masse mesurée m/z $[M-H]^- = 342,9336$

IRTF (dépôt liquide, $CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}) : 3353, 3056, 1642, 1597, 1450, 800 cm^{-1}

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 259 (4,11) 323 (3,50) 381 (3,24) nm

RMN 1H (400 MHz) et **RMN ^{13}C** (100 MHz) : voir tableau 10

- **5,7-dihydroxy-6-méthylphthalide (Uf3) :**



CCM : $R_f = 0,40$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

$R_f = 0,28$ (hexane/éther diéthylique/acide formique 130/80/20)

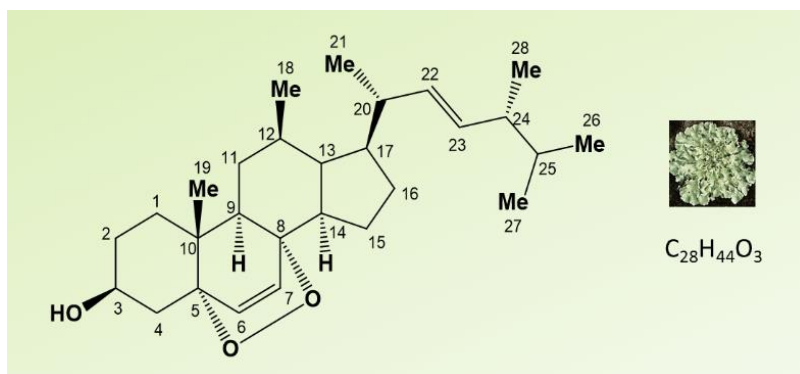
Couleur marron à l'ANS

SMHR-IES : masse attendue $m/z [M-H]^- = 179,0350$; masse mesurée $m/z [M-H]^- = 179,0349$

RMN 1H (400 MHz, CD_3OD) : 6,46 (s, 1H, H-4) ; 5,19 (s, 1H, CH_2 -3) ; 2,07 (s, 3H, CH_3 -6).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) : 174,3 (C-1) ; 165,2 (C-5) ; 156,9 (C-7) ; 148,2 (C-9) ; 112,6 (C-6) ; 103,8 (C-8) ; 101,2 (C-4) ; 71,2 (CH_2 -3) ; 8,0 (CH_3 -6).

• Peroxyde d'ergostérol (Fc4) :



Aspect : poudre blanche

CCM : $R_f = 0,37$ (toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70/20/5)

$R_f = 0,16$ (hexane/acétate d'éthyle 70/30)

$R_f = 0,81$ (toluène/acide acétique 10/4)

Coloration bleue intense à l'ANS

SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^- = 429,3363$; masse mesurée m/z $[M-H]^- = 429,3361$

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : 6,50 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz ; H-7) ; 6,24 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz ; H-6) ; 5,20 (m, 2H, H-22, H-23) ; 3,97 (m, 1H, H-3) ; 1,16-2,20 (m, 21H, CH_2 , CH) ; 1,00 (d, 3H, $J =$ Hz ; CH_3 -21) ; 0,89-0,91 (m, 6H, CH_3 -19, CH_3 -28) ; 0,81-0,83 (m, 9H, CH_3 -18, CH_3 -26, CH_3 -27).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) : 135,4 (CH-6) ; 135,2 (CH-22) ; 132,3 (CH-23) ; 130,7 (CH-7) ; 82,2 (C-5) ; 79,4 (C-8) ; 66,5 (CH-3) ; 56,2 (CH-17) ; 51,7 (CH-14) ; 51,1 (CH-9) ; 44,6 (C-13) ; 42,8 (CH-24) ; 39,7 (CH_2 -12) ; 39,3 (CH-20) ; 37,0 (CH_2 -4) ; 36,9 (C-10) ; 34,7 (CH_2 -1) ; 33,1 (CH-25) ; 31,9 (CH_2 -2) ; 28,6 (CH_2 -16) ; 23,4 (CH_2 -15) ; 20,9 (CH_3 -21) ; 20,6 (CH_2 -11) ; 19,9 (CH_3 -27) ; 19,6 (CH_3 -26) ; 17,6 (CH_3 -28) ; 13,0 (CH_3 -19) ; 12,9 (CH_3 -18).

V. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS & DES COMPOSES ISOLES

V.1. Activité antimicrobienne des extraits par méthode adaptée du challenge test

Un protocole adapté du challenge test a été utilisé pour évaluer l'activité antimicrobienne des trois extraits acétoniques vis-à-vis des souches microbiennes recommandées par la Pharmacopée Européenne, à savoir : *Staphylococcus aureus* (CIP 4.83 = ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (CIP 82.118 = ATCC 9027), *Escherichia coli* (CIP 53.126 = ATCC 8739), *Candida albicans* (ATCC 10231) et *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Les extraits acétoniques ont été solubilisés en solution aqueuse basique à 3 % de glycérine (pH ajusté à 8,5 par NaOH 1 M). Après stérilisation sur filtre seringue (0,2 µm), les solutions ont été diluées dans de l'eau distillée stérile à 3 % de glycérine pour atteindre des concentrations de 0,1 ; 0,075 et 0,05 % (masse/volume).

Les suspensions microbiennes (inocula) ont été préparées à 10^8 , 10^7 et 10^5 UFC/mL respectivement pour les bactéries, levures et champignons. Pour cela, la densité optique à 620 nm de la suspension de départ a été mesurée et des dilutions ont été effectuées en fonction du facteur de corrélation ϵ de la souche concernée (dans du milieu liquide Tryptone Soja pour les bactéries et du milieu liquide Sabouraud pour les levures et champignons). Une vérification de concentration a été réalisée par numération microbienne sur gélose.

Dans des tubes à hémolyse, les suspensions ont ensuite été mises en présence de chaque solution d'extrait pour atteindre des densités finales de 10^6 , 10^5 et 10^3 UFC/mL respectivement pour les bactéries, levures et champignons (volume total dans chaque tube : 500 µL). Des triplicats ont été effectués pour chaque condition et ont été incubés à température ambiante (20-25°C), à l'obscurité pendant 7 jours.

Pour chaque souche, des témoins ont été réalisés à pH 8,5 afin de vérifier l'inocuité de cette condition sur la croissance microbienne. Solubilisé de la même manière que les extraits, l'acide usnique commercial (Sigma Aldrich) a été employé comme contrôle positif (aux concentrations de 0,1 ; 0,075 et 0,05 %). Le Phénonip®, un conservateur employé en industrie cosmétique, a été utilisé comme second contrôle positif à la concentration de 0,8 % (masse/volume).

Afin de déterminer le nombre de micro-organismes vivants aux temps t_0 (au moment de la mise en contact entre l'inoculum et l'échantillon à tester) et t_7 (après 7 jours d'incubation), des dénombrements sur boîtes de Pétri (étalement de 100 µL) ont été effectués après incubation à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries (milieu Tryptone Soja), à 28°C pendant 48 heures pour les levures et à 28°C pendant 7 jours pour les champignons (milieu Sabouraud) (le nombre de micro-organismes est exprimé en Unité Formant Colonie par millilitre : UFC/mL).

Selon la Pharmacopée Européenne, l'activité antimicrobienne est évaluée en termes de réduction logarithmique du nombre de micro-organismes viables par rapport à la valeur obtenue pour l'inoculum à t0. Les résultats obtenus sont donc exprimés en Log (UFC/mL) et pour chaque condition, ceux-ci sont comparés avec la concentration en micro-organismes de l'inoculum de départ : ainsi, une diminution de la concentration par rapport à cet inoculum indique un effet microbicide de l'échantillon testé (mort microbienne), alors qu'une concentration stable (similaire à celle de l'inoculum à t0) témoigne d'un effet microbiostatique (absence de croissance microbienne).

V.2. Détermination des pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne et des CMI des extraits et des composés isolés sur *Staphylococcus aureus*

Une méthode en microplaque 96 puits a été utilisée afin de déterminer si les extraits et les composés isolés, mis au contact des bactéries à différentes concentrations, ont un effet sur la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* CIP 4.83.

Les extraits acétoniques ainsi que l'acide usnique ont été solubilisés dans l'acétone tandis que tous les autres composés ont été solubilisés dans le diméthylsulfoxyde. Les dilutions ont ensuite été effectuées dans du milieu de culture liquide Tryptone Soja (TS) pour atteindre les concentrations souhaitées (en µg/mL).

Les bactéries ont été repiquées dans du milieu TS liquide et incubées 24 heures à 37°C. L'inoculum à 10⁷ UFC/mL a ensuite été préparé en diluant la suspension bactérienne. Pour cela, la densité optique à 620 nm de la suspension de départ a été mesurée et des dilutions ont été effectuées en fonction du facteur de corrélation ϵ de la souche. Une vérification de concentration a été réalisée par numération microbienne sur gélose TS.

Chaque puits de la microplaque contient 100 µL d'inoculum ainsi que 100 µL de solution d'échantillon, soit une concentration bactérienne de 5.10⁶ UFC/mL par puits (10⁶ bactéries par puits). Les concentrations finales en produits testés dans les puits sont de 25, 30, 35 et 40 µg/mL pour les extraits, et comprises entre 1 et 12,5 µg/mL pour les composés isolés. Le témoin positif (100 µL d'inoculum + 100 µL de milieu TS) correspond au 100 % de prolifération bactérienne. Le témoin négatif (200 µL de TS) permet de vérifier l'absence de contamination du milieu de culture. Des triplicats ont été effectués pour chaque condition et les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

Pour chaque souche, des témoins ont également été réalisés en présence d'acétone et de diméthylsulfoxyde afin de vérifier leur inocuité sur la croissance bactérienne. Le Phénonip® (à 300 µg/mL) ainsi que la ciprofloxacine (à 1 µg/mL) ont été utilisés comme contrôles positifs après solubilisation dans l'eau et dilution dans du milieu de culture liquide Tryptone Soja.

Le nombre de bactéries vivantes (exprimé en UFC/mL) a été déterminé par numération sur boîtes de Pétri (après incubation à 37°C pendant 24 heures). Les pourcentages d'inhibition de croissance bactérienne des extraits bruts, des composés isolés et des témoins, ont été calculés *via* la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 \times \left[1 - \left[\frac{\text{Nb bactéries traitées} - \text{Nb bactéries t0}}{\text{Nb bactéries témoin t24} - \text{Nb bactéries t0}} \right] \right]$$

Avec :

- Nb bactéries traitées : nombre de bactéries après 24h de traitement à 37°C.
- Nb bactéries t0 : nombre de bactéries inoculées au temps t0.
- Nb bactéries t24 : nombre de bactéries témoin après incubation 24h à 37°C (sans traitement).

La concentration minimale inhibitrice, caractéristique de l'activité bactériostatique des extraits, des composés isolés et des témoins, et qui correspond à la plus petite concentration suffisante pour inhiber 99,9 % de la croissance bactérienne, a également été déterminée.

V.3. Technique de bioautographie sur *S. aureus*

La technique dite « agar overlay » a été utilisée pour les bioautographies sur la souche *Staphylococcus aureus* (CIP 4.83 = ATCC 6538).

Chaque échantillon a été solubilisé dans l'acétone, le chloroforme ou le méthanol pour atteindre une concentration de 1 mg/mL. Puis 50 µL (soit 50 µg) ont été déposés sur CCM (10 x 10 cm) pour les extraits acétoniques bruts, et entre 5 et 20 µL (soit entre 5 et 20 µg) pour les composés isolés. Un antibiotique (la ciprofloxacine) (500 ng) ainsi qu'un conservateur classiquement utilisé dans l'industrie cosmétique (le Phénopip®) (375 µg), ont également été déposés comme témoins positifs. Après migration dans l'éluant, les plaques ont été soigneusement séchées (à température ambiante sous la hotte) afin d'éliminer toute trace de solvant et déposées dans des boîtes de Pétri stériles (12 x 12 cm).

Une suspension bactérienne (DO₆₂₀ = 0,185 correspondant à environ 10⁸ UFC/mL) a été préparée dans du milieu tryptone soja, puis ajoutée à du milieu tryptone soja gélosé fondu (42°C) pour atteindre une densité finale de 10⁷ UFC/mL. Environ 15 mL de cette préparation ont été déposés délicatement en fine couche sur chaque plaque CCM.

Après solidification du milieu, les boîtes ont été mises à incuber à 30°C sous atmosphère humide pendant 24 heures. Les bioautogrammes ont ensuite été pulvérisés par une solution aqueuse de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) à 2,5 mg/mL (jaune) afin

d'observer les zones (ou halos) d'inhibition. Les bactéries vivantes se caractérisent par une coloration violette (réduction du MTT en cristaux de formazan), tandis que les zones d'inhibition claires indiquent l'activité antibactérienne des composés testés sur *S. aureus* (Figure 196).

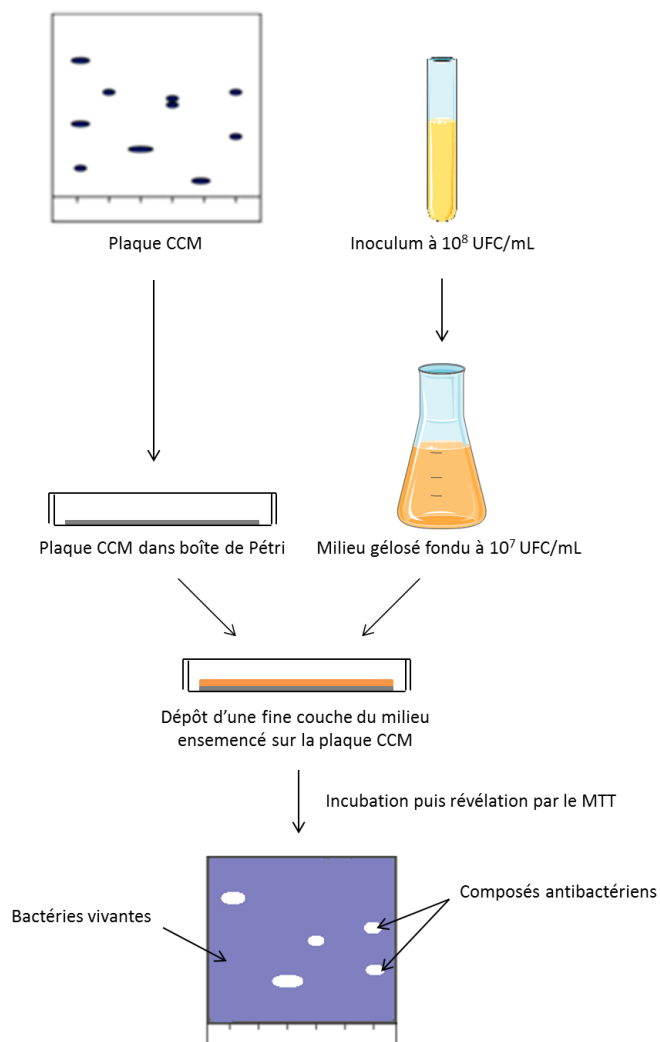


Figure 196 : Mise en place du test par bioautographie.

V.4. Analyses statistiques

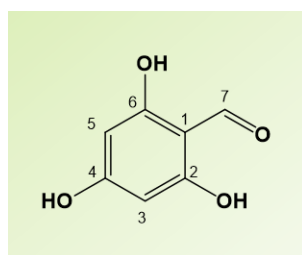
Les données ont été soumises à un test statistique de Student de type t (test non apparié). Celui-ci a pour but de déterminer la significativité des résultats. Si $p < 0,05$ alors le résultat est significatif (*). Un résultat est encore plus significatif si $p < 0,01$ (**) et un résultat est très significatif si $p < 0,01$ (***)

VI. OBTENTION DES PRECURSEURS DE L'ACIDE USNIQUE & DE LA CLADOXANTHONE A

VI.1. Acide usnique

VI.1.1. Synthèse du 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (1)

Dans un bicol de 100 mL, 2 g de phloroglucinol (16 mmol, 1 éq.) sont dissous dans 30 mL d'acétate d'éthyle. Dans une ampoule de coulée, placée sur le col latéral du bicol, sont placés 1,44 mL (16 mmol, 1 éq.) de trichlorure de phosphoryle (POCl_3) ainsi que 1,22 mL de diméthylformamide anhydre (DMF) (16 mmol, 1 éq.). Le mélange est ensuite ajouté goutte à goutte au phloroglucinol pendant environ 30 secondes. Après 3 heures de réaction à température ambiante, le précipité formé est filtré sur fritté, rincé par l'acétate d'éthyle froid, puis une recristallisation dans l'eau est effectuée. Après lyophilisation, le 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde attendu (1,7 g) est obtenu avec un rendement de 70 %.



Aspect : poudre orangée

CCM : $R_f = 0,66$ (chloroforme/éthanol 80/20)

Point de fusion : 197°C (décomposition)

SMHR-IES : masse attendue m/z $[\text{M-H}]^- = 153,0193$; masse mesurée m/z $[\text{M-H}]^- = 153,0199$

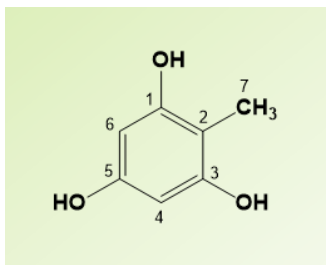
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : 11,47 (s, 2H, OH-2, OH-6) ; 10,67 (s, 1H, OH-4) ; 9,93 (s, 1H, H-7) ; 5,80 (s, 2H, H-3, H-5).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) : 190,9 (C-7) ; 167,2 (C-4) ; 164,1 (C-2, C-6) ; 104,5 (C-1) ; 94,1 (C-3, C-5).

IRTF (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) : 3544, 3131 (O-H) ; 2800 (C-H aldéhyde) ; 1645 (C=O) ; 1306, 1280 (C-O).

VI.1.2. Synthèse du méthylphloroglucinol (2)

Dans un ballon de 100 mL, 660 mg de 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (4,3 mmol, 1 éq.) sont solubilisés dans 10 mL de tétrahydrofurane anhydre. Le cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) (1,34 g, 21,4 mmol, 5 éq.) est ensuite ajouté puis le pH est ajusté à 4, tout au long de la réaction, par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 2 M. Après 2 heures à température ambiante, la réaction est stoppée par ajout de 4 mL d'eau puis des extractions par l'acétate d'éthyle (3 x 40 mL) sont effectuées. La phase organique est ensuite neutralisée par 10 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis séchée par le sulfate de magnésium. La purification par chromatographie éclair (phase normale, colonne de 40 g, gradient éther de pétrole/acétate d'éthyle 100:0 \rightarrow 50:50) permet l'obtention du méthylphloroglucinol (299 mg) avec un rendement de 50 %.



Aspect : poudre rougeâtre

CCM : $R_f = 0,60$ (chloroforme/éthanol 90/10)

Point de fusion : 203°C

SMHR-IES : masse attendue m/z $[\text{M}-\text{H}]^- = 181,0506$; masse mesurée m/z $[\text{M}-\text{H}]^- = 181,0511$

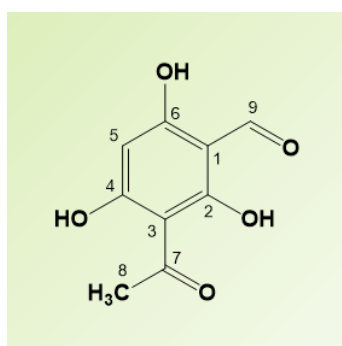
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : 8,79 (s, 2H, OH-1, OH-3) ; 8,66 (s, 1H, OH-5) ; 5,76 (s, 2H, H-4, H-6) ; 1,80 (s, 3H, CH_3 -7).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) : 156,4 (C-1, C-3) ; 155,5 (C-5) ; 100,7 (C-2) ; 94,0 (C-4, C-6) ; 8,0 (C-7).

IRTF (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) : 3422, 3338 (O-H) ; 1439 (déformation CH_3) ; 1146, 1082 (C-O).

VI.1.3. Synthèse du 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (4)

Dans un bicol de 25 mL, 204 mg de phloroacétophénone (1,2 mmol, 1 éq.) sont dissous dans 5 mL d'acétate d'éthyle. Dans une ampoule de coulée, sont placés 170 μ L (1,8 mmol, 1,5 éq.) de trichlorure de phosphoryle (POCl_3) ainsi que 90 μ L de diméthylformamide anhydre (DMF) (1,8 mmol, 1,5 éq.). Le mélange est ensuite ajouté goutte à goutte à la phloroacétophénone pendant environ 30 secondes. Après 24 heures de réaction à température ambiante, le précipité formé est filtré sur fritté, rincé par l'acétate d'éthyle froid, puis une recristallisation dans l'eau est effectuée. Après lyophilisation, le 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde attendu est obtenu avec des rendements respectifs de 43 %.



Aspect : poudre rosée

CCM : $R_f = 0,91$ (chloroforme/éthanol 80/20)

Point de fusion : 179°C

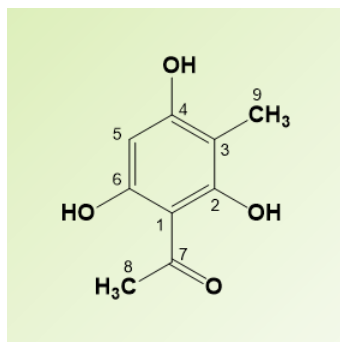
SMHR-IES : masse attendue m/z $[\text{M}-\text{H}]^- = 195,0299$; masse mesurée m/z $[\text{M}-\text{H}]^- = 195,0296$

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : 14,85 (br s, 1H, OH-6) ; 13,63 (br s, 1H, OH-2) ; 12,34 (br s, 1H, OH-4) ; 9,99 (s, 1H, H-9) ; 5,89 (s, 1H, H-5) ; 2,61 (s, 3H, CH_3 -9).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) : 203,3 (C-7) ; 191,8 (C-9) ; 170,8 (C-6) ; 169,9 (C-2) ; 167,7 (C-4) ; 103,9 (C-1) ; 103,4 (C-5) ; 94,3 (C-3) ; 32,4 (C-8).

IRTF (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) : 3527, 3401 (O-H) ; 2612 (C-H aldéhyde) ; 1618 (large, C=O aldéhyde et cétone) ; 1285, 1240 (C-O).

VI.1.4. Synthèse de la méthylphloroacétophénone (3)



Aspect : poudre beige/orangée

CCM : $R_f = 0,64$ (éther de pétrole/acétate d'éthyle 40/60)

Point de fusion : 208°C

SMHR-IES : masse attendue m/z $[\text{M-H}]^- = 139,0401$; masse mesurée m/z $[\text{M-H}]^- = 139,0400$

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : 13,94 (s, 1H, OH-2) ; 10,52 (s, 1H, OH-6) ; 10,28 (s, 1H, OH-4) ; 6,00 (s, 1H, H-5) ; 2,55 (s, 3H, CH_3 -8) ; 1,83 (s, 3H, CH_3 -9)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) : 202,4 (C-7) ; 163,3 (C-2) ; 162,6 (C-4) ; 160,0 (C-6) ; 103,8 (C-1) ; 101,3 (C-3) ; 93,9 (C-5) ; 32,4 (C-8) ; 7,3 (C-9).

IRTF (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) : 3401, 3200 (O-H) ; 1627 (C=O) ; 1112, 1085 (C-O).

VI.1.4.1. Par acétylation du méthylphloroglucinol

Le méthylphloroglucinol (314 mg, 2,24 mmol, 1 éq.) est solubilisé à chaud (130°C) dans 4,5 mL d'acide acétique. Sont ensuite ajoutés le trifluorure de bore (332 μL , 1,2 éq.) puis l'anhydride acétique (254 μL , 1,2 éq.). Après 4 heures de réaction à 130°C , 5 mL d'eau sont ajoutés puis des extractions par l'acétate d'éthyle sont effectuées (2 x 50 mL). La phase organique est ensuite neutralisée par 10 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis séchée par le sulfate de magnésium. Après purification par chromatographie éclair (phase normale, colonne de 40 g, gradient éther de pétrole/acétate d'éthyle 100/0 \rightarrow 50/50), la méthylphloroacétophénone est obtenue avec un rendement de 70 %.

VI.1.4.2. Par réduction du 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde

Dans un ballon de 25 mL, 90 mg de 3-acétyl-2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (0,46 mmol, 1 éq.) sont solubilisés dans 3 mL de tétrahydrofurane anhydre. Le cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) (144 mg, 2,3 mmol, 5 éq.) est ensuite ajouté puis le pH est ajusté à 4, tout au long de la réaction, par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 2 M. Après 2 heures à température ambiante, la réaction est stoppée par ajout de 2 mL d'eau puis des extractions par l'acétate d'éthyle (3 x 10 mL) sont effectuées. La phase organique est ensuite neutralisée par 3 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis séchée par le sulfate de magnésium. La purification par chromatographie sur couche mince préparative (phase normale, chloroforme/éthanol 80/20) permet l'obtention de la méthylphloroacétophénone avec un rendement de 21,5 %.

VI.1.4.3. Par méthylation directe de la phloroacétophénone

Après solubilisation de 5 g de phloroacétophénone (préalablement lyophilisée, 29,7 mmol, 1 éq.) dans 30 mL de méthanol anhydre, 6 mL de méthanolate de sodium à 5 M (29,7 mmol, 1 éq.) et 9,2 mL d'iodométhane (148,5 mmol, 5 éq.) sont ajoutés. La réaction est conduite sous flux d'argon, à 0°C pendant 45 heures. Après évaporation à sec du milieu réactionnel, la purification du brut en trois fois par chromatographie éclair (phase inverse, colonne 80 g, gradient méthanol/eau 50/50 → 60/40) conduit à l'obtention de la méthylphloroacétophénone avec un rendement de 43 %.

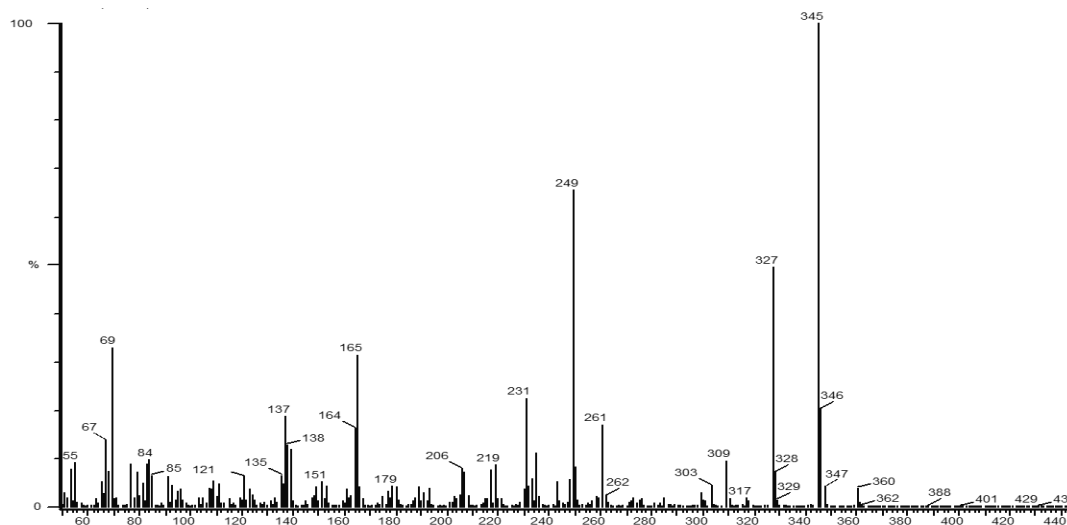
VI.1.5. Réactions de couplage de la méthylphloroacétophénone

VI.1.5.1. Réaction de Barton

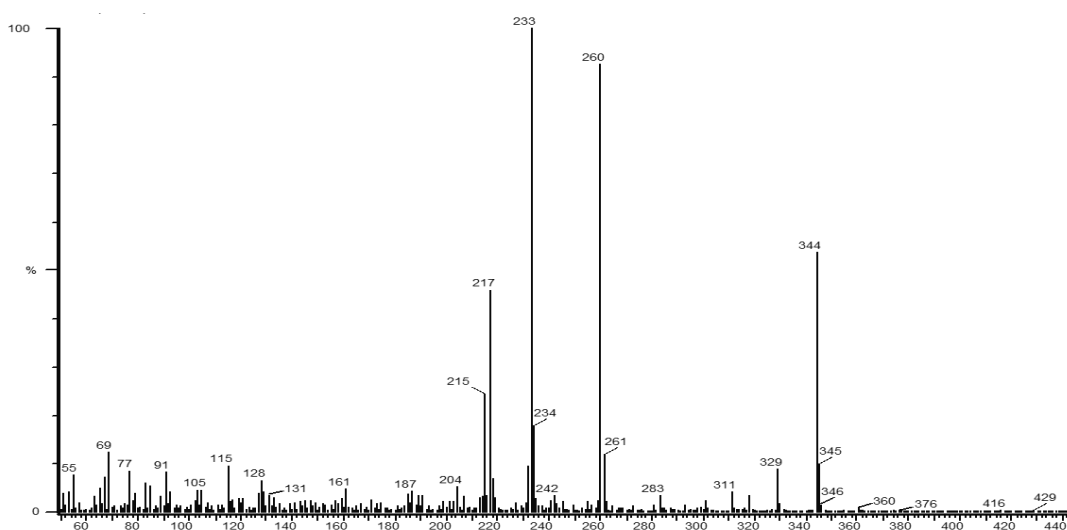
La réaction est conduite sous flux d'azote. Dans un bicol de 25 mL, 60 mg de carbonate de sodium (0,57 mmol, 4,4 éq) sont solubilisés dans 1,5 mL d'eau à température ambiante. La solution est refroidie à 0°C avant d'introduire 23,6 mg de méthylphloroacétophénone (0,13 mmol, 1 éq.). Le ferricyanure de potassium (65 mg, 0,20 mmol, 1,5 éq) est solubilisé dans 1,6 mL d'eau puis ajouté goutte à goutte (pendant environ 30 minutes). Après 30 minutes à froid et acidification du milieu par une solution d'acide sulfurique 6 N, une extraction par l'éther diéthylique est effectuée (2 x 2 mL). La phase organique est séchée par du sulfate de magnésium et évaporée à sec pour obtenir le résidu R1.

Pour l'étape de déshydratation, le résidu R1 est repris par 500 μL d'acide sulfurique concentré puis laissé sous agitation à 0°C pendant 5 minutes. Une extraction par 1 mL de chloroforme est effectuée puis l'évaporation à sec conduit au brut R2 (16 mg). Dans les deux bruts (R1 et R2), les acides

hydrousnique et usnique ont été détectés par analyse en CPG-SM avec des temps de rétention respectifs moyens de 20,65 et 23,95 minutes. Leurs spectres de masses sont présentés ci-après.



Spectre de masse de l'acide hydrousnique obtenu en impact électronique.



Spectre de masse de l'acide usnique obtenu en impact électronique.

VI.1.5.2. En présence de porphyrine octachlorée métallée au fer

Essais 5 et 6 : dans un ballon de 5 mL, 25 mg de méthylphloroacétophénone (0.135 mmol, 1 éq.) sont solubilisés dans 2 mL de méthanol. La porphyrine octachlorée métallée au fer (13 mg, 10 % M pour l'essai 5, et 26 mg, 20 % M pour l'essai 6) ainsi que le peroxyde d'hydrogène (12 μ L, 1 éq.) sont ensuite ajoutés. La réaction est conduite sous agitation et à reflux (70°C) pendant 3 heures.

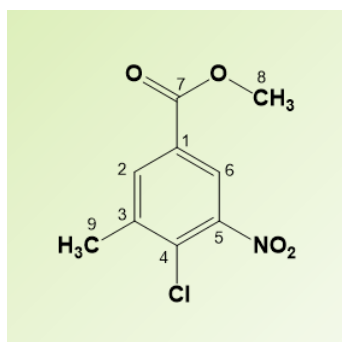
Essai 7 : dans un ballon de 5 mL, 25 mg de méthylphloroacétophénone (0.135 mmol, 1 éq.) sont solubilisés dans 2 mL de méthanol. La porphyrine octachlorée métallée au fer (13 mg, 10 % M ou 26 mg, 20 % M) ainsi que le peroxyde d'hydrogène (12 μ L, 1 éq.) sont ensuite ajoutés. La réaction est conduite à température ambiante pendant 5 heures.

Dans les trois cas, les bruts réactionnels ont été analysés par CPG-SM et l'acide hydrosulfurique a été mis en évidence et repéré par comparaison avec les chromatogrammes obtenus lors du couplage effectué dans les conditions décrites par Barton *et al.* (1956).

VI.2. Cladoxanthone A

VI.2.1. Synthèse du 4-chloro-3-méthyl-5-nitrobenzoate de méthyle (6)

Dans un bicol de 25 mL, le 4-chloro-3-méthylbenzoate de méthyle (2,5 g, 13,5 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 5 mL d'acide sulfurique à 0°C. En parallèle, 2,65 mL d'acide nitrique (56,4 mmol, 4,2 éq.) et 2,65 mL d'acide sulfurique (50 mmol, 3,7 éq.) sont mélangés à 0°C. Cette solution est ensuite introduite en goutte à goutte à la première. La réaction est conduite à 0°C pendant 30 minutes sous agitation puis le milieu réactionnel est versé sur 50 mL d'un mélange eau-glace. Après extraction par l'acétate d'éthyle (4 x 30 mL), neutralisation par une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et séchage par le sulfate de magnésium, l'évaporation du filtrat conduit à une huile jaune correspondant au mélange des trois régioisomères. La purification par chromatographie éclair en phase inverse (méthanol/eau 70/30) permet d'obtenir le 4-chloro-3-méthyl-5-nitrobenzoate de méthyle avec un rendement de 40 %.



Aspect : solide blanc fibreux

CCM : $R_f = 0,90$ (éther de pétrole/acétate d'éthyle 50/50)

Point de fusion : 80°C

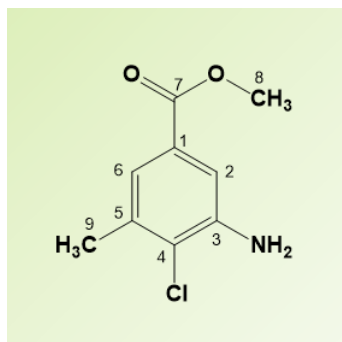
SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^+ = 230,0215$; masse mesurée m/z $[M-H]^+ = 230,0217$

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : 8,24 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz ; H-6) ; 8,12 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz ; H-2) ; 3,96 (s, 3H, CH_3 -8) ; 2,54 (s, 3H, CH_3 -9).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : 164,5 (C-7) ; 149,0 (C-5) ; 140,0 (C-2) ; 134,3 (C-3) ; 130,9 (C-4) ; 129,0 (C-1) ; 123,6 (C-6) ; 52,9 (C-8) ; 20,6 (C-9).

IRTF (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) : 1735 (C=O) ; 1537 (N=O) ; 1300, 1203 (C-O) ; 747 (C-Cl).

VI.2.2. Synthèse du 3-amino-4-chloro-5-méthylbenzoate de méthyle (7)



Aspect : poudre jaunâtre

CCM : $R_f = 0,40$ (éther de pétrole/acétate d'éthyle 50/50)

Point de fusion : 68°C

SMHR-IES : masse attendue m/z $[\text{M-H}]^+ = 200,0473$; masse mesurée m/z $[\text{M-H}]^+ = 200,0478$

RMN ^1H (400 MHz, acétone- d_6) : 7,37 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz ; H-6) ; 7,20 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz ; H-2) ; 5,16 (br s, 2H, NH_2 -3) ; 3,83 (s, 3H, CH_3 -8) ; 2,35 (s, 3H, CH_3 -9).

RMN ^{13}C (100 MHz, acétone- d_6) : 167,1 (C-7) ; 145,6 (C-3) ; 137,4 (C-5) ; 129,7 (C-4) ; 123,7 (C-1) ; 120,1 (C-6) ; 114,5 (C-2) ; 52,2 (C-8) ; 20,6 (C-9).

IRTF (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) : 3481, 3369 (N-H) ; 1709 (C=O) ; 1254, 1236 (C-O) ; 764 (C-Cl).

VI.2.2.1. Par réduction du composé nitré en présence de palladium sur charbon

Dans un ballon de 50 mL, 390 mg de 4-chloro-3-méthyl-5-nitrobenzoate de méthyle (1,7 mmol, 1 éq.) sont solubilisés dans 15 mL de méthanol puis 5 % (m/v) de palladium sur charbon sont ajoutés. La réaction est maintenue sous agitation en présence de dihydrogène, et à température ambiante pendant 10 heures. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur fritté et Célite®. Après évaporation à sec du filtrat, la reprise du résidu par 4 mL d'acétate d'éthyle conduit à la formation d'un précipité. La purification du surnageant par chromatographie circulaire centrifuge (éluant : chloroforme) permet l'obtention du composé aminé d'intérêt avec un rendement de 42 %.

VI.2.2.2. Par réduction du composé nitré en présence de chlorure d'étain

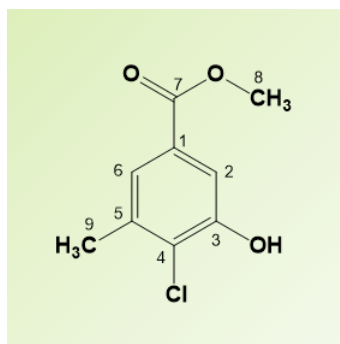
Dans un ballon de 10 mL, 220 mg de 4-chloro-3-méthyl-5-nitrobenzoate de méthyle (0,95 mmol, 1 éq.) sont solubilisés dans 1,9 mL d'éthanol absolu à chaud puis 1,08 g de chlorure d'étain anhydre sont ajoutés (4,8 mmol, 5 éq.). La réaction est conduite à reflux (70°C) pendant 30 minutes sous flux d'argon. Après ajout de glace, le milieu est neutralisé par une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis extrait par l'acétate d'éthyle (3 x 5 mL). Une fois la phase organique évaporée à sec, la purification sur plaques préparatives dans le chloroforme permet l'obtention du composé attendu avec un rendement de 65 %.

VI.2.3. Synthèse du 4-chloro-3-hydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle (8)

De nombreux essais ont été effectués concernant l'étape de diazotation-hydroxylation du 3-amino-4-chloro-5-méthylbenzoate de méthyle. Les deux seuls essais (notés 1 et 3) ayant permis d'obtenir le composé attendu sont les suivants :

Essai 4 : dans un ballon de 10 mL, 210 mg de composé **(7)** (1,05 mmol, 1 éq.) sont dissous dans un mélange d'eau (4,43 mL, 1,05 mmol, 1 éq.) et d'acide sulfurique (277 µL, 1,05 mmol, 1 éq.). Le ballon est ensuite plongé dans un bain de glace et le nitrite de sodium (72,6 mg, 1,05 mmol, 1 éq.), solubilisé dans 1 mL d'eau, est ajouté. Le mélange est laissé sous agitation à 0°C pendant 10 minutes puis ajouté, dans un bicol de 50 mL, à une solution de sulfate de cuivre préalablement préparée et portée à reflux (443 mg de CuSO₄ (1,05 mmol, 1 éq.) dissous dans 7,8 mL d'eau). Après 45 minutes, le précipité obtenu est filtré et le filtrat est extrait par le chloroforme (3 x 15 mL). La phase organique est séchée par le sulfate de magnésium puis évaporée sous vide (m = 61 mg). Enfin, la purification sur CCM préparative dans le chloroforme conduit au produit attendu avec un faible rendement de 2 % (4,5 mg).

Essai 5 : dans un tube à hémolyse, le nitrite de sodium (18,6 mg, 0,27 mmol, 1,1 éq.) est solubilisé dans 133 µL d'acide sulfurique concentré. Le mélange est porté à environ 60°C puis 50 mg du composé **(7)** sont ajoutés (0,25 mmol, 1 éq.). Après 3 heures 30 à 60°C, le milieu réactionnel est transféré dans un ballon de 25 mL puis 10 mL d'eau sont ajoutés. Le mélange est ensuite porté à 100°C pendant 2 heures. Le précipité obtenu est filtré et le filtrat est extrait par le chloroforme (3 x 5 mL). La phase organique est séchée par le sulfate de magnésium puis évaporée sous vide (m = 33 mg). Enfin, la purification sur CCM préparative dans le chloroforme conduit au produit attendu avec un faible rendement de 8 % (4 mg).



Aspect : poudre orangée

CCM : $R_f = 0,28$ (chloroforme)

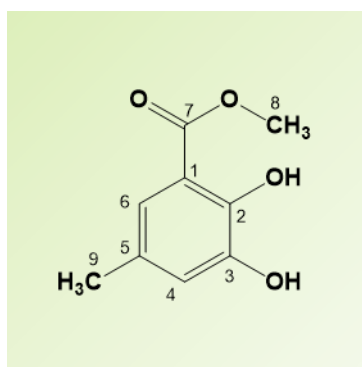
SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^+ = 201,0313$; masse mesurée m/z $[M-H]^+ = 201,0312$

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : 7,53 (br s, 1H, H-6 ou H-2) ; 7,51 (br s, 1H, H-6 ou H-2) ; 5,69 (br s, 1H, OH-3) ; 3,92 (s, 3H, CH_3 -8) ; 2,42 (s, 3H, CH_3 -9).

IRTF (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) : 3700 (O-H) ; 1705 (C=O) ; 1263 (C-O) ; 758 (C-Cl).

VI.2.4. Synthèse du 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle (9)

Dans un ballon de 25 mL, 500 mg d'acide 2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoïque (3 mmol, 1 éq.) sont dissous dans 8 mL de méthanol puis 800 μ L d'acide sulfurique (3 mmol, 1 éq.) sont ajoutés. La réaction est conduite pendant 24 heures à 80°C. Après évaporation à sec, le brut est repris par 10 mL d'acétate d'éthyle puis des lavages à l'eau sont effectués (5 x 10 mL). La phase organique est ensuite séchée par le sulfate de magnésium. Enfin, la purification sur CCM préparative dans le chloroforme conduit au produit attendu avec un rendement de 80 % (541 mg).



Aspect : poudre vert kaki

CCM : $R_f = 0,78$ (chloroforme/méthanol 90/10)

Point de fusion : 100°C

SMHR-IES : masse attendue m/z $[M-H]^+ = 183,0652$; masse mesurée m/z $[M-H]^+ = 183,0653$

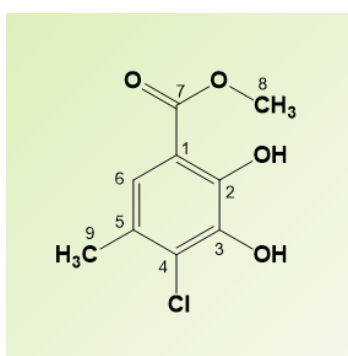
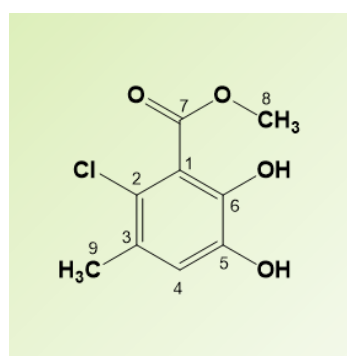
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : 10,67 (s, 1H, OH-2) ; 7,16 (s, 1H, H-6) ; 6,94 (s, 1H, H-4) ; 5,65 (br s, 1H, OH-3) ; 3,94 (s, 3H, CH_3 -8) ; 2,25 (s, 3H, CH_3 -9).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : 171,0 (C-7) ; 146,9 (C-2) ; 144,9 (C-3) ; 129,0 (C-6) ; 121,1 (C-4) ; 120,5 (C-5) ; 112,1 (C-1) ; 52,6 (C-8) ; 21,0 (C-9).

IRTF (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) : 3380 (O-H) ; 1673 (C=O aldéhyde) ; 1304 (C-O).

VI.2.5. Synthèse du 4-chloro-2,3-dihydroxy-5-méthylbenzoate de méthyle (**10**)

Six essais ont été menés afin d'obtenir ce composé. Les trois premiers ont été effectués en présence de NCS et de FeCl_3 dans le DMF, l'essai 4 dans le chloroforme et l'essai 5 dans le méthanol en présence de peroxyde d'hydrogène et d'acide chlorhydrique. Contrairement à l'essai 5, les essais 1 à 3, 4 et 6 ont conduit à l'obtention du composé (**10**) souhaité (ainsi qu'à son régioisomère (**10a**)).

Composé (**10**)Composé (**10a**)

Essais 1 à 3 : après solubilisation du composé (**9**) dans le DMF, le NCS et le FeCl_3 sont ajoutés puis la réaction est conduite pendant des temps variables à température ambiante. Les conditions mises en œuvre pour les trois essais sont reportées dans le tableau ci-dessous :

Essais	Composé (9)	DMF	NCS	FeCl_3	Durée (h)
1	63 mg	1,5 mL	60 mg (1,2 éq.)	6 mg (0,1 éq.)	22
2	252 mg		185 mg (1 éq.)	247 mg (1,1 éq.)	40
3	124 mg		88 mg (1 éq.)	213,5 mg (2 éq.)	40

Dans les trois cas, le brut réactionnel est évaporé à sec puis repris par 10 mL de chloroforme. Des lavages par une solution d'acide chlorhydrique à 10 % (4 x 5 mL) sont effectués puis la phase organique est séchée par du sulfate de magnésium avant d'être analysée par CPG-SM pour détecter le produit (**10**) souhaité.

Essai 5 : dans un ballon de 5 mL, le produit (**9**) (100 mg, 0,55 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 1,5 mL de méthanol. L'acide chlorhydrique est ensuite ajouté (91 μL , 1,1 mmol, 2 éq.) puis le mélange est placé dans un bain d'eau à 10-15°C. Une solution est préparée avec 50 μL de peroxyde d'hydrogène (0,605 mmol, 1,1 éq.) dans 100 μL de méthanol puis ajoutée lentement en goutte à goutte au mélange précédent (10 μL /minute pendant 15 minutes). La réaction est ensuite conduite à reflux (65°C) pendant 24 heures. Après évaporation à sec, le brut est repris par 5 mL d'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (3 x 5

mL) puis séché par du sulfate de magnésium. La phase organique est ensuite analysée par CPG-SM afin de détecter le produit **(10)** attendu.

Essai 6 : dans un ballon bicol de 25 mL, le produit **(9)** (200 mg, 1,1 mmol, 1 éq.) est dissous dans 6,9 mL d'éther diéthylique anhydre. Le chlorure de sulfuryle (97 μ L, 1,1 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 2,7 mL d'éther diéthylique anhydre puis ajouté goutte à goutte à la solution précédente (ajout sur 30 minutes). La réaction est ensuite conduite à température ambiante pendant 22 heures. Le brut réactionnel est évaporé à sec, repris dans le dichlorométhane puis analysé par CPG-SM afin de détecter le produit **(10)** attendu.

Pour les 5 essais, la formation du composé **(10)** ainsi que de son régioisomère **(10a)** a été observée.

Le brut de l'essai 2 (256 mg), obtenu après évaporation de la phase organique, a été purifié par chromatographie éclair en phase normale (colonne 40 g) avec un gradient toluène/acétate d'éthyle (100/0 \rightarrow 0/100) et un débit de 20 mL/minute. L'analyse d'une fraction (128 mg), correspondant au composé **(9)** et aux deux régioisomères monochlorés **(10)** et **(10a)**, par CPG-SM et RMN (^1H , ^{13}C , HMBC, HMQC) a permis d'attribuer les structures de ces deux derniers composés à leurs pics correspondants sur le chromatogramme.

Le brut de l'essai 5 (250 mg) a été purifié par CCM préparative dans un mélange chloroforme/éthanol 97/3 pour conduire au composé monochloré attendu **(10)** avec un rendement de 3 % (7 mg).

CPG-SM : spectres de masse ; cf Figure 188.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) ; **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) : cf Tableau 26.

Références bibliographiques

- Aalto-Korte, K.; Lauerma, A.; Alanko, C. *Contact Dermatitis* **2005**, 52, 36-38.
- Abad, A.; Fernández-Molina, J. V.; Bikandi, J.; Ramírez, A.; Margareto, J.; Sendino, J.; Hernando, F. L.; Pontón, J.; Garaizar, J.; Rementeria, A. *Revista Iberoamericana de Micología* **2010**, 27 (4), 155-182.
- Abbayes, H. des. *Bulletin de la Société scientifique de Bretagne* **1939**, 16, 1-156.
- Abdel-Lateff, A.; Klemke, C.; König, G. M.; Wright, A. D. *Journal of Natural Products* **2003**, 66, 706-708.
- Abdou, R.; Scherlach, K.; Dahse, H.-M.; Sattler, I.; Hertweck, C. *Phytochemistry* **2010**, 71, 110-116.
- Aberhart, D. J.; Overton, K. H.; Huneck, S. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1969**, 704-707.
- Ahti, T., Cladoniaceae. *Flora Neotropica* **2000**, 78, pp. 1-362. Published by: New York Botanical Garden Press on behalf of Organization for Flora Neotropica.
- Airparif, rapport d'activités **2012**. Accessible en ligne : http://www.airparif.asso.fr/_pdf/publications/2012.pdf, 153 p.
- Akpınar, A. U.; Ozturk, S.; Sinirtas, M. *Plant, Soil and Environment* **2009**, 55 (4), 154-158.
- Al-Massarani, S. M.; El Gamal, A. A.; Al-Musayeib, N. M.; Mothana, R. A.; Basudan, O. A.; Al-Rehaily, A. J.; Farag, M.; Assaf, M. H.; El Tahir, K. H.; Maes, L. *Molecules* **2013**, 18, 10599-10608.
- Amo de Paz, G.; Raggio, J.; Gómez-Serranillos, M. P.; Palomino, O. M.; González-Burgos, E.; Carretero, M. E.; Crespo, A. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, 53, 165-171.
- Andrews, J. M. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2001**, 48, Suppl. S1, 5-16.
- Andrioli, W. J.; Silva, T. M.; Silva, V. B. da; Damásio, A. R. L.; Maller, A.; Conti, R.; Jorge, J. A.; Araújo, J. M.; Silva, C. H. T. P.; Pupo, M. T.; Polizeli, M. L. T. M.; Bastos, J. K. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2012**, 74, 156-161.
- Aprile, G. G.; Catalano, I.; Migliozi, A.; Mingo, A., Monitoring epiphytic lichen biodiversity to detect environmental quality and air pollution: the case study of Roccamonfina Park (Campania Region - Italy). In *Air Pollution - New Developments*, Anca Maria Moldoveanu, Ed. **2011**, 227-244.
- Armaleo, D.; Sun, X.; Culberson, C. *Mycologia* **2011**, 103 (4), 741-754.
- Armaleo, D.; Zhang, Y.; Cheung, S. *Mycologia* **2008**, 100, 565-576.
- Armstrong, R. A.; Bradwell, T. *Symbiosis* **2011**, 53, 1-16.
- Armstrong, R. A.; Welch, A. R. *Symbiosis* **2007**, 43, 1-12.
- Articus, K.; Mattsson, J.-E.; Tibell, L.; Grube, M.; Wedin, M. *Mycological Research* **2002**, 106 (4), 412-418.
- Asahina, Y.; Shibata, S., Chemistry of lichen substances. *Japan Society for the Promotion of Science*, Asher & Co. Ltd. (Vaals), Ed. **1971**, p 165.
- Asplund, J.; Gauslaa, Y. *The Lichenologist* **2007**, 39 (3), 273-278.
- Atalay, F.; Halici, M. B.; Mavi, A.; Çakir, A.; Odabaşoğlu, F.; Kazaz, C.; Aslan, A.; Küfrevioğlu, Ö. I. *Turkish Journal of chemistry* **2011**, 35, 647-661.
- Aubert, N.; Ameller, T.; Legrand, J.-J. *Food and Chemical Toxicology* **2012**, 50, 445-454.

Aubert, S.; Juge, C.; Boisson, A.-M.; Gout, E.; Bligny, R. *Planta* **2007**, 226, 1287-1297.

Bachelor, F. W.; King, G. G. *Phytochemistry* **1970**, 9, 2587-2589.

Backhouse, T.; McGookin, A.; Matchet, J.; Robertson, A.; Tittensor, E. *Journal of the Chemical Society* **1948**, 0, 113-115.

Bačkorová, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Jendželovský, R.; Fedoročko, P. *Toxicology in Vitro* **2011**, 25, 37-44.

Bačkorová, M.; Jendželovský, R.; Kello, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Fedoročko, P. *Toxicology in Vitro* **2012**, 26, 462-468.

Baker, P. M.; Bullock, E. *Canadian Journal of Chemistry* **1969**, 47, 2733-2734.

Barhate, N. B.; Gajare, A. S.; Wakharkar, R. D.; Bedekar, A. V. *Tetrahedron* **1998**, 39, 6349-6350.

Barhate, N. B.; Gajare, A. S.; Wakharkar, R. D.; Bedekar, A. V. *Tetrahedron* **1999**, 55, 11127-11142.

Barton, D. H. R.; Deflorin, A. M.; Edwards, O. E. *Journal of the Chemical Society* **1956**, 530-534.

Bates, S. T.; Crospey, G. W. G.; Caporaso, J. G.; Knight, R.; Fierer, N. *Applied and Environmental Microbiology* **2011**, 1309-1314.

Bazin, M.-M.; Le Lamer, A.-C.; Delcros, J.-G.; Rouaud, I.; Uriac, P.; Boustie, J.; Corbel, J.-C.; Tomasi, S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, 16, 6860-6866.

Behera, B. C.; Mahadik, N.; Morey, M. *Pharmaceutical Biology* **2012**, 50 (8), 968-979.

Bellamy, F. D.; Ou, K. *Tetrahedron Letters* **1984**, 25 (8), 839-842.

Bessadottir, M.; Egilsson, M.; Einarsdottir, E.; Magnusdottir, I. H.; Ogmundsdottir, M. H.; Omarsdottir, S.; Ogmundsdottir, H., M. *PLOS ONE* **2012**, 7 (12), 1-7.

Bézivin, C.; Tomasi, S.; Rouaud, I.; Delcros, J. G.; Boustie, J. *Planta Medica* **2004**, 70 (9), 874-877.

Bharate, S. B.; Bhutani, K. K.; Khan, S. I.; Tekwani, B. L.; Jacob, M. R.; Khan, I. A.; Singh, I. P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, 1750-1760.

Białońska, D.; Dayan, F. E. *Journal of Chemical Ecology* **2005**, 31 (12), 2975-2991.

Birch, A. J.; Baldas, J.; Hlubucek, J. R.; Simpson, T. J.; Westerman, P. W. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1976**, 898-904.

Bjerke, J. W.; Elvebakk, A.; Domínguez, E.; Dahlback, A. *Phytochemistry* **2005**, 66, 337-344.

Bjerke, J. W.; Joly, D.; Nilsen, L.; Brossard, T. *Polar Biology* **2004**, 27, 409-417.

Bjerke, J. W.; Lerfall, K.; Elvebakk, A. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2002**, 1, 678-685.

Bonny, S.; Hitti, E.; Boustie, J.; Bernard, A.; Tomasi, S. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 7651-7656.

Bonny, S.; Paquin, L.; Carrié, D.; Boustie, J.; Tomasi, S. *Analytica Chimica Acta* **2011**, 707, 69-75.

Botineau, M.; Ghestem, A. *Acta Botanica Gallica* **1995**, 142 (6), 585-594.

Boustie, J.; Tomasi, S.; Grube, M. *Phytochemistry Reviews* **2011**, 10, 287-307.

Bovonsombat, P.; Ali, R.; Khan, C.; Leykajakul, J.; Pla-on, K.; Aphimanchindakul, S.; Pungcharoenpong, N.; Timsuea, N.; Arunrat, A.; Punpongjareorn, N. *Tetrahedron* **2010**, 66, 6928-6935.

Bowman, S. M.; Free, S. J. *BioEssays* **2006**, 28, 799-808.

Brandänge, S.; Mörch, L.; Vallén, S. *Acta Chemica Scandinavica* **1975**, 29 (8), 889-890.

Brieger, G.; Nestrick, T. J. *Chemical Reviews* **1974**, 74 (5), 567-580.

- Brisdelli, F.; Perilli, M.; Sellitri, D.; Piovano, M.; Garbarino, J. A.; Nicoletti, M.; Bozzi, A.; Amicosante, G.; Celenza, G. *Phytotherapy Research* **2013**, 27 (3), 431-437.
- Bruno, M.; Trucchi, B.; Burlando, B.; Ranzato, E.; Martinotti, S.; Akkol, E. K.; Süntar, I.; Keleş, H.; Verotta, L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013a**, 21, 1834-1843.
- Bruno, M.; Trucchi, B.; Monti, D.; Romeo, S.; Kaiser, M.; Verotta, L. *ChemMedChem* **2013b**, 8 (2), 221-225.
- Bruun, T. *Acta Chemica Scandinavica* **1965**, 19, 1677-1693.
- Bruun, T.; Lamvik, A. *Acta Chemica Scandinavica* **1971**, 25, 483-486.
- Büdel, B.; Scheidegger, C., Thallus morphology and anatomy. In *Lichen biology*, Nash T. H. III, Ed. **1996**. Cambridge University Press, Cambridge, pp 37-64.
- Bugnet, E. A.; Brough, A. R.; Greatrex, R.; Kee, T. P. *Tetrahedron* **2002**, 58, 8059-8065.
- Burgess, L.E. *Synthetic communications* **1997**, 27, 2181-2191.
- Burkholder, P. R.; Evans, A. W.; McVeigh, I.; Thornton, H. K. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1944**, 30 (9), 250-255.
- Burlando, B.; Ranzato, E.; Volante, A.; Appendino, G.; Pollastro, F.; Verotta, L. *Planta Medica* **2009**, 75, 607-613.
- Campanella, L.; Delfini, M.; Ercole, P.; Iacoangeli, A.; Risuleo, G. *Biochimie* **2002**, 84, 329-334.
- Cansaran, D.; Kahya, D.; Yurdakulol, E.; Atakol, O. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* **2006**, 61c, 773-776.
- Cansaran Duman, D. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* **2009**, 66 (4), 153-160.
- Cansaran Duman, D.; Aras, S.; Atakol, O. *Journal of Applied Biological Sciences* **2008**, 2 (3), 41-44.
- Cardarelli, M.; Serino, G.; Campanella, L.; Ercole, P.; De Cicco Nardone, F.; Alesiani, O.; Rossiello, F. *Cellular and Molecular Life Sciences* **1997**, 53, 667-672.
- Cardinale, M.; Müller, H.; Berg, G.; Castro, J. de; Grube, M. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* **2008**, 66, 63-71.
- Cardinale, M.; Puglia, A. M.; Grube, M. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* **2006**, 57, 484-495.
- Carlin, G. *Graphis Scripta* **1986**, 1, 29-32.
- Carlos, I. Z.; Carli, C. B. A.; Maia, D. C. G.; Benzatti, F. P.; Lopes, F. C. M.; Roese, F. M.; Watanabe, M.; Micheletti, A. C.; Dos Santos, L. C.; Vilegas, W.; Honda, N. K. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2008**, 19 (4), 847-852.
- Carvalho, C. F.; Sargent, M. V. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1984**, 7, 1621-1626.
- Castle, H.; Kubsch, F. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1949**, 23 (1), 158-160.
- Černajová, I.; Svoboda, D. *Fungal Ecology* **2014**, 11, 8-16.
- Cetin, H.; Tufan-Cetin, O.; Turk, A. O.; Tay, T.; Candan, M.; Yanikoglu, A.; Sumbul, H. *Parasitology Research* **2008**, 102, 1277-1279.
- Chakor, N.; Patil, G.; Writer, D.; Periyasamy, G.; Sharma, R.; Roychowdhury, A.; Mishra, P. D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, 6608-6610.
- Chatenet, P.; Botineau, M. *Cryptogamie Mycologie* **2001**, 22 (3), 225-237.
- Chauthe, S. K.; Bharate, S. B.; Sabde, S.; Mitra, D.; Bhutani, K. K.; Singh, I. P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18, 2029-2036.

- Chen, G.-D.; Chen, Y.; Gao, H.; Shen, L.-Q.; Wu, Y.; Li, X.-X.; Li, Y.; Guo, L.-D.; Cen, Y.-Z.; Yao, X.-S. *Journal of Natural Products* **2013**, 76 (4), 702-709.
- Chen, H.; Nilsen, C. N.; Choudhury, A.; Sorgi, K. L. *Arkivoc* **2008**, 14, 1-6.
- Chen, Y.-W.; Lee, D.-S. *Journal of Nanoparticles* **2013**, article ID 132180, 1-10.
- Chester, D. O.; Elix, J. A. *Australian Journal of Chemistry* **1981**, 34, 1501-1506.
- Chester, D. O.; Elix, J. A.; Kennedy, J. M. *Australian Journal of Chemistry* **1986**, 39, 1759-1764.
- Chollet-Krugler, M.; Tomasi, S.; Uriac, P.; Toupet, L.; van de Weghe, P. *Dalton Transactions* **2008**, 6524-6528.
- Choma, I. M.; Grzelak, E. M. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 2684-2691.
- Chomcheon, P.; Wiyakrutta, S.; Sriubolmas, N.; Ngamrojanavanich, N.; Kengtong, S.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. *Phytochemistry* **2009**, 70, 407-413.
- Clerc, P. *Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie* **1984**, 5 (4), 333-360.
- Cochietto, M.; Skert, N.; Nimis, P. L. *Naturwissenschaften* **2002**, 89, 137-146.
- Coker, P. D. *The Lichenologist* **1967**, 3 (3), 428-428.
- Connolly, J. D.; Freer, A. A.; Huneck, S. *Phytochemistry* **1984**, 23 (3), 702-702.
- Conover, M. A.; Mierzwa, R.; King, A.; Loebenberg, D.; Bishop, W. R.; Puar, M.; Patel, M.; Coval, S. J.; Hershenhorn, J.; Strobel, G. A. *Phytochemistry* **1992**, 31 (89), 2999-3001.
- Culberson, C. F., Chemical and botanical guide to lichen products. University of North Carolina Press **1969**. Chapel Hill, N. C., p 628.
- Culberson, C. F.; Elix, J. A., Lichen substances. In *Methods in Plant Biochemistry*. Volume 1, Plant Phenolics, Harborne, Ed. **1989**, pp 509-536.
- Culberson, W. L. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1970**, 1, 153-170.
- Culberson, W. L.; Culberson, C. F.; Johnson, A. *Mycologia* **1982**, 74 (4), 662-667.
- Cuny, D.; Van Haluwyn, C.; Caron, B.; Languereau, F. *Nova Hedwigia* **1997**, 64 (1-2), 103-110.
- Dai, M.; Yuan, X.; Zhu, Z.-J.; Shan, L.; Liu, R.-H.; Sun, Q.-Y.; Zhang, W.-D. *Archiv der Pharmazie, Chemistry in Life Sciences* **2013**, 346, 314-320.
- Davies, J.; Davies, D. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2010**, 4 (3), 417-433.
- Davies, J.; Wang, H.; Taylor, T.; Warabi, K.; Huang, X.-H.; Andersen, R. J. *Organic Letters* **2005**, 7, 5233-5236.
- De Carvalho, E. A. B.; Andrade, P. P.; Silva, N. H.; Pereira, E. C.; Figueiredo, R. C. B. Q. *Micron* **2005**, 36, 155-161.
- Dembitsky, V. M.; Tolstikov, G. A. *Chemistry for Sustainable Development* **2004**, 12, 13-18.
- De Vera, J.-P. *Fungal Ecology* **2012**, 5, 472-479.
- Dieu, A.; Millot, M.; Champavier, Y.; Mambu, L.; Chaleix, V.; Sol, V.; Gloaguen, V. *Planta Medica* **2014**, 80, 1-5.
- Din, L. B.; Zakaria, Z.; Wahid Samsudin, M.; Elix, J. A. *Sains Malaysiana* **2010**, 39 (6), 901-908.
- Ding, G.; Li, Y.; Fu, S.; Liu, S.; Wei, J.; Che, Y. *Journal of Natural Products* **2009**, 72, 182-186.
- Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé. Efficacité de la conservation antimicrobienne (partie 5.1.3.). Pharmacopée Européenne, 8ème éd. Disponible en ligne : <http://online6.edqm.eu/ep800/#>.
- Dobson, F. S., Lichens - An Illustrated Guide to the British and Irish Species, 5^{ème} éd. revue et corrigée **2005**, Richmond Publishing Co. Ltd, Slough, England. 480 p.

D'Urso de Souza Mendes, C.; de Souza Antunes, A. M. *Antibiotics* **2013**, 2, 500-534.

Eifler-Lima, V. L.; Sperry, A.; Sinbandhit, S.; Boustie, J.; Tomasi, S.; Schenkel, E. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2000**, 38, 472-474.

Einarsdóttir, E.; Groeneweg, J.; Björnsdóttir, G. G.; Harethardottir, G.; Omarsdóttir, S.; Ingólfssdóttir, K.; Ogmundsdóttir, H. M. *Planta Medica* **2010**, 76 (10), 969-974.

Eisenreich, W.; Knispel, N.; Beck, A. *Phytochemistry Reviews* **2011**, 10, 445-456.

Elix, J. A., Biochemistry and secondary metabolites. In *Lichen biology*. Nash T. H., Ed. **1996**. Cambridge University Press, Cambridge, pp 154-180.

Elix, J. A.; Bennett, S. A. *Australian Journal of Chemistry* **1990**, 43, 1587-1590.

Elix, J. A.; Chappell, H. M.; Jiang, H. *The Bryologist* **1991**, 94 (3), 304-307.

Elix, J. A.; Crook, C. E. *The Bryologist* **1992**, 95 (1), 52-64.

Elix, J. A.; Crook, C. E.; Jiang, H.; Zhi-ning, Z. *Australian Journal of Chemistry* **1992**, 45, 845-855.

Elix, J. A.; Gaul, K. L.; Jiang, H. *Australian Journal of Chemistry* **1993**, 46, 95-110.

Elix, J. A.; Gaul, K. L.; Sterns, M.; Samsudin, M. W. *Australian Journal of Chemistry* **1987**, 10, 1169-1178.

Elix, J. A.; Jones, A. J.; Lajide, L.; Coppins, B. J.; James, P. W. *Australian Journal of Chemistry* **1984**, 37, 2349-2364.

Elix, J. A.; Kennedy J. M. *Australian Journal of Chemistry* **1985**, 38, 1857-1861.

Elix, J. A.; Musidlak, H. W.; Sala, T.; Sargent, M. V. *Australian Journal of Chemistry* **1978**, 31 (1), 145-155.

Elix, J. A.; Portelli, V. J. *Australian Journal of Chemistry* **1990**, 43, 1773-1778.

Elix, J. A.; Robertson, F.; Wardlaw, J. H.; Willis, A. C. *Australian Journal of Chemistry* **1994**, 47, 2291-2295.

Emmerich, R.; Giez, I.; Lange, O. L.; Proksch, P. *Phytochemistry* **1993**, 33 (6), 1389-1394.

Esslinger, T. L. *The Bryologist* **1972**, 75 (1), 79-81.

Falk, A.; Green, T. K.; Barboza, P. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1182, 141-144.

Favero-Longo, S. E.; Piervittori, R. *Journal of Plant Interactions* **2010**, 5 (3), 163-177.

Fazio, A. T.; Adler, M. T.; Bertoni, M. D.; Sepúlveda, C. S.; Damonte, E. B.; Maier, M. S. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* **2007**, 62c, 543-549.

Feige, G. B.; Lumbsch, H. T. *Journal of Chromatography* **1993**, 646, 417-427.

Fernández, E.; Quilhot, W.; Rubio, C.; Hidalgo, M. E.; Diaz, R.; Ojeda, J. *Photochemistry and Photobiology* **2006**, 82, 1065-1068.

Fernández, E.; Reyes, A.; Hidalgo, M. E.; Quilhot, W. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1998**, 42, 195-201.

Feuerer, T.; Hawksworth, D. L. *Biodiversity and Conservation* **2007**, 16, 85-98.

Finnegan, R. A.; Merkel, K. E. *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, 37 (19), 2986-2989.

Fiscus, A. S. *The Bryologist* **1972**, 75 (3), 299-304.

Fitzpatrick, L.; Sala, T.; Sargent, M. V. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1980**, 85-89.

Fotie, J.; Bohle, D. S. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* **2006**, 5, 15-31.

Fournet, A.; Ferreira, M. E.; Rojas de Arias, A.; Torres de Ortiz, S.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Quilhot, W.; Fernandez, E.; Hidalgo, M. E. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **1997**, 116 (1), 51-54.

Fox, C. H.; Huneck, S. *Phytochemistry* **1969**, 8, 1301-1304.

Francolini, I.; Norris, P.; Piozzi, A.; Donelli, G.; Stoodley, P. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, 48 (11), 4360-4365.

Francolini, I.; Taresco, V.; Crisante, F.; Martinelli, A.; D'Ilario, L.; Piozzi, A. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, 14, 7356-7369.

Furin, G. G.; Luzina, O. A.; Polovinka, M. P.; Salakhutdinov, N. F.; Tolstikov, G. A. *Russian Chemical Bulletin, International Edition* **2007**, 56 (6), 1244-1248.

Gan, Z.; Hu, B.; Song, Q.; Xu, Y. *Synthesis* **2012**, 44, 1074-1078.

Garcia-Junceda, E.; Gonzalez, A.; Vicente, C. *Phyton - International Journal of Experimental Botany* **1985**, 45 (2), 153-158.

Gardini Brandão, L. F.; Alcantara, G. B.; Cepa Matos, M. de F.; Bogo, D.; Santos Freitas, D. dos; Oyama, N. M.; Honda, N. K. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2013**, 61 (2), 176-183.

Gauslaa, Y. *Oecologia* **2005**, 143, 94-105.

Gauslaa, Y.; McEvoy, M. *Basic and Applied Ecology* **2005**, 6, 75-82.

Giallombardo, D.; Nevin, A. C.; Lewis, W.; Nawrat, C. C.; Kitson, R. R. A.; Moody, C. J. *Tetrahedron* **2014**, 70, 1283-1288.

Giordano, S.; Basile, A.; Lanzetta, R.; Corsaro, M. M.; Spagnuolo, V.; Castaldo, R. C. *Allelopathy Journal* **1997**, 4 (1), 89-100.

Glad, T.; Barboza, P.; Mackie, R. I.; Wright, A.-D. G.; Brusetti, L.; Mathiesen, S. D.; Sundset, M. A. *Current Microbiology* **2014**, 68, 724-728.

Goldner W. R.; Hoffman, F. M.; Medve, R. J. *Canadian Journal of Botany* **1986**, 64, 1586-1590.

Gollapudi, S. R.; Telikepalli, H.; Jampani, H. B.; Mirhom, Y. W.; Drake, S. D.; Bhattiprolu, K. R.; Vander Velde, D.; Mitscher, L. A. *Journal of Natural Products* **1994**, 57 (7), 934-938.

Gombert, S.; Asta, J.; Seaward, M. R. D. *Ecological Indicators* **2006**, 6, 429-443.

Gonzalez, A. G.; Rodriguez Perez, E. M.; Hernandez Padron, C. E.; Bermejo Barrera, J. *Zeitschrift für Naturforschung* **1992**, 47 (7-8), 503-507.

González-Tejero, M. R.; Martínez-Lirola, M. J.; Casares-Porcel, M.; Molero-Mesa, J. *Economic Botany* **1995**, 49 (1), 96-98.

Goward, T.; Ahti, T.; Elix, J. A.; Spribille, T. *Botany* **2010**, 88, 345-351.

Grover, P. K.; Shah, G. D.; Shah, R. C. *Journal of Chemical Society* **1955**, 3982-3985.

Grube, M.; Berg, G. *Fungal Biology Reviews* **2009**, 23 (3), 72-85.

Guo, L.; Shi, Q.; Fang, J. L.; Mei, N.; Ali, A. A.; Lewis, S. M.; Leakey, J. E.; Frankos, V. H. *Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* **2008**, 26 (4), 317-338.

Gupta, V. K.; Verma, S.; Gupta, S.; Singh, A.; Pal, A.; Srivastava, S. K.; Srivastava, P. K.; Singh, S. C.; Darokar, M. P. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **2012**, 31, 3375-3383.

Guschina, I. A.; Hardwood, J. L. *Phytochemistry* **2006**, 67, 1731-1739.

Häffner, E.; Lomský, B.; Hynek, V.; Hällgren J. E.; Batič, F.; Pfanz, H. *Water, Air, and Soil Pollution* **2001**, 131, 185-201.

Halama, P.; Van Haluwyn, C. *BioControl* **2004**, 49, 95-107.

Harvey, D. R.; Norman, R. O. C. *Journal of the Chemical Society* **1961**, 3604-3610.

Hauck, M.; Huneck, S. *The Lichenologist* **2007**, 39 (3), 301-304.

Hauck, M.; Jürgens, S.-R.; Huneck, S.; Leuschner, C. *Environmental Pollution* **2009a**, 157, 2776-2780.

Hauck, M.; Willenbruch, K.; Leuschner, C. *Journal of Chemical Ecology* **2009b**, 35, 71-73.

Hawranik, D. J.; Anderson, K. S.; Simmonds R.; Sorensen, J. L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 2383-2385.

Hertel, H.; Andreev, M. P. *The Bryologist* **2003**, 106 (4), 539-551.

Hett, E. C.; Rubin, E. J. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* **2008**, 72 (1), 126-156.

Hidalgo, M. E.; Fernández, E.; Ponce, M.; Rubio, C.; Quilhot, W. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2002**, 66, 213-217.

Hidalgo, M. E.; Fernández, E.; Quilhot, W.; Lissi, E. *Phytochemistry* **1994**, 37 (6), 1585-1587.

Himmelreich, U.; Huneck, S.; Feige, G. B.; Lumbsch, H. T. *Zeitschrift für Naturforschung* **1994**, 49 (9), 1289-1291.

Högnabba, F.; Stenroos, S.; Thell, A.; Myllys, L. *Bibliotheca Lichenologica* **2009**, 99, 163-184.

Honda, N. K.; Pavan, F. R.; Coelho, R. G.; Andrade Leite, S. R. de; Micheletti, A. C.; Lopes, T. I. B.; Misutsu, M. Y.; Beatriz, A.; Brum, R. L.; Leite, C. Q. F. *Phytomedicine* **2010**, 17, 328-332.

Hu, L. H.; Yip, S. C.; Sim, K. Y. *Phytochemistry* **1999**, 52, 1371-1373.

Huneck, S. *Naturwissenschaften* **1999**, 86, 559-570.

Huneck, S.; Akinniyi, J. A.; Cameron, A. F.; Connolly, J. D.; Mulholland, A. G. *Tetrahedron Letters* **1981**, 22, 351-352.

Huneck, S.; Culberson, C. F.; Culberson, W. L.; Elix, J. A. *Phytochemistry* **1991**, 30 (2), 706-707.

Huneck, S.; Elix, J.A. *Herzogia* **1993**, 9, 647-651.

Huneck, S.; Höfle, G. *Tetrahedron* **1978**, 34, 2491-2502.

Huneck, S.; Yoshimura, I., In: Identification of lichen substances; Heidelberg: Springer-Verlag, **1996**, p 219.

Huovinen, K.; Ahti, T.; Stenroos, S. *Annales Botanici Fennici* **1989**, 26, 133-148.

Hyvärinen, M.; Walter, B.; Koopman, R. *Oikos* **2002**, 96, 273-280.

Ingólfssdóttir, K. *Phytochemistry* **2002**, 61, 729-736.

Ingólfssdóttir, K.; Chung, G. A. C.; Skúlason, V. G; Gissurarson, S. R.; Vilhelmsdóttir, M. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **1998**, 6, 141-144.

Inventaire National du Patrimoine Naturel, inventaire ZNIEFF Limousin. *Museum National d'Histoire Naturelle*, Ed. **2013**. Accessible en ligne : <http://inpn.mnhn.fr/zone/znieff/region/74/limousin>.

Ivanova, V.; Bačkor, M.; Dahse, H.-M.; Graefe, U. *Preparative Biochemistry & Technology* **2010**, 40, 377-388.

Jiang, Q.; Sheng, W.; Tian, M.; Tang, J.; Guo, C. *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, 1861-1866.

Johansson, S.; Söchting, U.; Elix, J. A.; Wardlaw, J. H. *Mycological Progress* **2005**, 4 (2), 139-148.

Jones, A. J.; Elix, J. A.; Engkaninan, U. *Australian Journal of Chemistry* **1976**, 29 (9), 1947-1954.

Joulain, D.; Tabacchi, R. *Flavor and Fragrance Journal* **2009**, 24, 49-61.

Kannangara, B. T. S. D. P.; Rajapaksha, R. S. C. G.; Paranagama, P. A. *Letters in Applied Microbiology* **2009**, 48, 203-209.

- Karagöz, A.; Doğruöz, N.; Zeybek, Z.; Aslan, A. *Journal of Medicinal Plants Research* **2009**, 3 (12), 1034-1039.
- Kim, J. A.; Hong, S. G.; Cheong, Y. H.; Koh, Y. J.; Hur, J.-S. *Mycologia* **2012**, 104 (2), 362-370.
- Kim, S.-W.; Park, S.-S.; Min, T.-J.; Yu, K.-H. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **1999**, 20 (7), 819-823.
- Kiran, B. M.; Mahadevan, K. M. *Heterocyclic Communications* **2006**, 12 (6), 481-484.
- Kirkelund Hansen, S.; Rainey, R. B.; Haagensen, J. A. J.; Molin, S. *Nature* **2007**, 445, 533-536.
- Koh, J.; Greaves, A. J.; Kim, J. P. *Dyes and Pigments* **2003**, 56, 69-81.
- Kohlhardt-Floehr, C.; Boehm, F.; Troppens, S.; Lademann, J.; Truscott, T. G. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2010**, 101, 97-102.
- Kokubun, T.; Shiu, W. K. P.; Gibbons, S. *Planta Medica* **2007**, 73 (2), 176-179.
- Koparal, A. T.; Tüylü, B. A.; Türk, H. *Natural Product Research* **2006**, 20 (14), 1300-1307.
- Kornsakulkarn, J.; Saepua, S.; Laksanacharoen, P.; Rachtawee, P.; Thongpanchang, C. *Tetrahedron Letters* **2013**, 54, 3813-3815.
- Kortepeter, S. A. *Journal of Undergraduate Sciences* **1996**, 3, 71-73.
- Kosanić, M.; Manojlović, N.; Janković, S.; Stanojković, T.; Ranković, B. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, 53, 112-118.
- Kosanić, M.; Ranković, B.; Stanojković, T. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2012**, 92 (9), 1909-1916.
- Kranner, I.; Cram, M. J.; Zorn, M.; Wornik, S.; Yoshimura, I.; Stabentheiner, E.; Pfeifhofer, H. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, 102 (8), 3141-3146.
- Kristmundsdóttir, T.; Aradóttir, H. A.; Ingólfssdóttir, K.; Ögmundsdóttir, H. M. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2002**, 54, 1447-1452.
- Kukwa, M. *Polish Botanical Journal* **2005**, 50 (1), 69-73.
- Kulkarni, P. S. *Asian KJournal of Biochemical and Pharmaceutical Research* **2012**, 2 (2), 227-230.
- Kumar, S. K. C.; Müller, K. *Journal of Natural Products* **1999**, 62, 817-820.
- Kupchan, S. M.; Kopperman, H. L. *Experientia* **1975**, 31 (6), 625-625.
- Kutney, J. P.; Sanchez, I. H. *Canadian Journal of Chemistry* **1976**, 54, 2795-2803.
- Lange, O. L.; Green, T. G. A.; Heber, U. *Journal of Experimental Botany* **2001**, 52 (363), 2033-2042.
- Lauinger, I. L.; Vivas, L.; Perozzo, R.; Stairiker, C.; Tarun, A.; Zloh, M.; Zhang, X.; Xu, H.; Tonge, P. J.; Franzblau, S. G.; Pham, D.-H.; Esguerra, C. V.; Crawford, A. D.; Maes, L.; Tasdemir, D. *Journal of Natural Products* **2013**, 76, 1064-1070.
- Lauterwein, M.; Oethinger, M.; Belsner, K.; Peters, T.; Marre, R. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, 39 (1), 2541-2543.
- Lawrey, J. D. *The Bryologist* **1983**, 86 (4), 365-369.
- Lawrey, J. D. *The Bryologist* **1989**, 92 (3), 326-328.
- Lawrey, J. D.; Diederich, P. *The Bryologist* **2003**, 106 (1), 80-120.
- Lawrey, J. D.; Torzilli, A. P.; Chandhoke, V. *American Journal of Botany* **1999**, 86 (2), 184-189.
- Legouin, B.; Uriac, P.; Tomasi, S.; Toupet, L.; Bondon, A.; van de Weghe, P. *Organic Letters* **2009**, 11 (3), 745-748.
- Lengyel, I.; Cesare, V.; Stephani, R. *Synthetic Communications* **1998**, 28 (10), 1891-1896.
- Lewis, L. A.; McCourt, R. M. *American Journal of Botany* **2004**, 91 (10), 1535-1556.

- Leyte-Lugo, M.; Figueroa, M.; González, M. C.; Glenn, A. E.; González-Andrade, M.; Mata, R. *Phytochemistry* **2013**, 96, 273-278.
- Liba, C. M.; Ferrara, F. I. S.; Mangio, G. P.; Fantinatti-Garboggini, F.; Albuquerque, R. C.; Pavan, C.; Ramos, P. L.; Moreira-Filho, C. A.; Barbosa, C. R. *Journal of Applied Microbiology* **2006**, 101, 1076-1086.
- LIMAIR, rapport d'activités **2012**. Accessible en ligne : <http://www.limair.asso.fr/assets/files/publications-limair/2013/RA-2012.pdf>
- Lisci, M.; Monte, M.; Pacini, E. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2003**, 51, 1-17.
- Lohézic-Le Dévéhat, F.; Tomasi, S.; Elix, J. A.; Bernard, A.; Rouaud, I.; Uriac, P.; Boustie, J. *Journal of Natural Products* **2007**, 70, 1218-1220.
- Lucarini, R.; Tozatti, M. G.; Oliveira Salloum, A. I. de; Crotti, A. E. M.; Silva, M. L. A.; Gimenez, V. M. M.; Groppo, M.; Januário, A. H.; Martins, C. H. G.; Cunha, W. R. *African Journal of Biotechnology* **2012**, 11 (20), 4636-4639.
- Lumbsch, H. T.; Feige, G. B.; Elix, J. A. *Botanica Acta* **1994**, 107, 30-35.
- Luzina, O. A.; Polovinka, M. P.; Salakhutdinov, N. F.; Tolstikov, G. A. *Russian Journal of Organic Chemistry* **2009**, 45 (12), 1783-1789.
- Maciąg-Dorszyńska, M.; Węgrzyn, G.; Guzew-Krzemińska, B. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* **2014**, 353, 57-62.
- Macías, F. A.; Molinillo, J. M. G.; Varela, R. M.; Galindo, J. C. G. *Pest Management Science* **2007**, 63, 327-348.
- Magoulas, G. E.; Papaioannou, D. *Molecules* **2014**, 19, 19769-19835.
- Mahajan, T.; Kumar, L.; Dwivedi, K.; Agarwal, D. D. *Industrial & Engineering Research* **2012**, 51, 3881-3886.
- Maier, M. S.; Rosso, M. L.; Fazio, A. T.; Adler, M. T.; Bertoni, M. D. *Journal of Natural Products* **2009**, 72, 1902-1904.
- Mallat, T.; Baiker, A. *Applied Catalysis A: General* **2000**, 200, 3-22.
- Manojlović, N.; Ranković, B.; Kosanić, M.; Vasiljević, P.; Stanojković, T. *Phytomedicine* **2012**, 19, 1166-1172.
- Marston, A. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 2676-2683.
- Masters, K.-S.; Bräse, S. *Chemical Reviews* **2012**, 112, 3717-3776.
- Mathey, A.; Spittler, P.; Steglich, W. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* **2002**, 57c, 565-567.
- McCune, B. *Bulletin of the California Lichen Society* **2006**, 13 (2), 42-44.
- McDonald, T. R.; Gaya, E.; Lutzoni, F. *Symbiosis* **2013**, 59, 165-171.
- McLean, S.; Mahler, P.; Nyburg, S. C.; Sawyer, J. F.; Webster, C. J.; Wong-Ng, W. *Canadian Journal of Chemistry* **1983**, 61, 2055-2058.
- McLean, S.; Purvis, O. W.; Williamson, B. J.; Bailey, E. H. *Nature* **1998**, 391, 649-650.
- Mei, H.; VanDerveer, D.; DesMarteau, D.D. *Journal of Fluorine Chemistry* **2013**, 145, 35-40.
- Melgarejo, M.; Sterner, O.; Vila Castro, J.; Mollinedo, P. *Revista Boliviana de Química* **2008**, 25 (1), 24-29.
- Mengwasser, J. H. "Lead compounds from nature: Synthesis of natural xanthenes and chroman aldehydes that inhibit HIV-1", **2011**. Graduate Theses and Dissertations. 103 p.
- Michael, A. *American Chemical Journal* **1883**, 5, 81.
- Micheletti, A. C.; Honda, N. K.; Lima, D. P.; Beatriz, A.; Sant'ana, M. R.; Carvalho, N. C. P.; Matos, M. F. C.; Queiróz, L. M. M.; Bogo, D.; Zorzatto, J. R. *Química Nova* **2011**, 34, 1014-1020.

- Millot, M.; Di Meo, F.; Tomasi, S.; Boustie, J.; Trouillas, P. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2012**, 111, 17-26.
- Millot, M.; Kaouadji, M.; Champavier, Y.; Gamond, A.; Simon, A.; Chulia, A.-J. *Phytochemistry Letters* **2013**, 6, 31-35.
- Millot, M.; Tomasi, S.; Articus, K.; Rouaud, I.; Bernard, A.; Boustie, J. *Journal of Natural Products* **2007**, 70, 316-318.
- Millot, M.; Tomasi, S.; Studzinska, E.; Rouaud, I.; Boustie, J. *Journal of Natural Products* **2009**, 72, 2177-2180.
- Mitchell, J. C. *The journal of Investigative* **1966**, 47 (2), 167-168.
- Mitchell, J. C.; Shibata, S. *The journal of Investigative* **1969**, 52 (6), 517-168.
- Mitrović, T.; Stamenković, S.; Cvetković, V.; Tosić, S.; Stanković, M.; Radojević, I.; Stefanović, O.; Čomić, L.; Đačić, D.; Ćurčić, M.; Marković, S. *International Journal of Molecular Sciences* **2011**, 12, 5428-5448.
- Mohanty, S.; Grover, S. K. *Current Science* **1988**, 57 (10), 537-538.
- Molnár, K.; Farkas, E. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* **2010**, 65, 157-173.
- Morales Mendez, A.; Garcia, M. I.; Perez, S. *Anales de Quimica* **1985**, 81 (1), 66-68.
- Moreau, S.; Varache-Lembège, M.; Larrouture, S.; Fall, D.; Neveu, A.; Deffieux, G.; Vercauteren, J.; Nuhrich, A. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 37, 237-253.
- Mosbach, K. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1964**, 17 (4), 363-367.
- Muggia, L.; Schmitt, I.; Grube, M. *SIM NEWS* **2009**, may/june, pp. 85-97.
- Mukhopadhyay, S.; Chandnani, K. H.; Chandalia, S. B. *Organic Process Research & Development* **1999**, 3, 196-200.
- Müller, K. *Applied Microbiology & Biotechnology* **2001**, 56, 9-16.
- Murtagh, G. J.; Dyer, P. S.; Crittenden, P. D. *Nature* **2000**, 404, 564-564.
- Nakagawa-Goto, K.; Lee, K.-H. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47 (47), 8263-8266.
- Narender, N.; Srinivasu, P.; Kulkarni, S. J.; Raghavan, K. V. *Synthetic Communications* **2002**, 32 (2), 279-286.
- Negi, J. S.; Bisht, V. K.; Singh, P.; Rawat, M. S. M.; Joshi, G. P. *Journal of Applied Chemistry* **2013**, Article ID 621459, 1-9.
- Ngoupayo, J.; Tabopda, T. K.; Ali, M. S. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2008**, 56 (10), 1466-1469.
- Nguyen, K. H.; Chollet-Krugler, M.; Gouault, N.; Tomasi, S. *Natural Product Reports* **2013**, 30 (12), 1490-1508.
- Nikolić, V.; Stanković, M.; Nikolić, L.; Nikolić, G.; Ilić-Stojanović, S.; Popsavin, M.; Zlatković, S.; Kundaković, T. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2013**, 76, 173-182.
- Nimis, P. L.; Skert, N. *Environmental and Experimental Botany* **2006**, 55, 175-182.
- Nishanth, K.S.; Sreerag, R.S.; Deepa, I.; Mohandas, C.; Nambisan, B. *Natural Product Research* **2014**, 30, 1-4.
- Nunes, P. S.; Albubquerque-Júnior, R. L. C.; Cavalcante, D. R. R.; Dantas, M. D. M.; Cardoso, J. C.; Bezerra, M. S.; Souza, J. C. C.; Russo Serafini, M.; Quitans-Jr, L. J.; Bonjardim, L. R.; Araújo, A. A. S. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**, published online: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/761593>, article ID 761593, 9 p.
- Nybakken, L.; Solhaug, K. A.; Bilger, W.; Gauslaa, Y. *Oecologia* **2004**, 140, 211-216.
- Nybakken, L.; Helmersen, A.-M.; Gauslaa, Y.; Selås, V. *Journal of Chemical Ecology* **2010**, 36, 298-304.
- Obermayer, W.; Randlane, T. *The Bryologist* **2012**, 115 (1), 51-60.

- Odabaşoğlu, F.; Çakir, A.; Suleyman, H.; Aslan, A.; Bayir, Y.; Halici, M.; Kazaz, C. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, 103, 59-65.
- Ohmura, Y. *Memoirs of the National Science Museum National Science Museum, Tokyo* **2012**, 48, 91-137.
- Oksanen, I. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, 73, 723-734.
- Okuyama, E.; Umeyama, K.; Yamazaki, M.; Kinoshita, Y.; Yamamoto, Y. *Planta Medica* **1995**, 61 (2), 113-115.
- Olafsdottir, E. S.; Ingolfssdottir, K. *Planta Medica* **2001**, 67, 199-208.
- Olsen, P.; Meyer, O.; Bille, N.; Würtzen, G. *Food and Chemical Toxicology* **1986**, 24 (1), 1-12.
- Omarsdottir, S.; Freysdottir, J.; Olafsdottir, E. S. *Phytomedicine* **2007**, 14, 179-184.
- Osyczka, P. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **2009**, 78 (3), 215-219.
- Ôtsuka, H.; Komiya, T.; Tsukui, M.; Toyosato, T.; Matsuoka, T.; Fujimura, H.; Hiramatsu, Y. *Journal of the Takeda Research Laboratory* **1972**, 31, 247-254.
- Ozenda, P.; Clauzade, G., Les lichens: étude biologique et flore illustrée **1970** 816 p.
- Parrot, D.; Peresse, T.; Hitti, E.; Carrie, D.; Grube, M.; Tomasi, S. *Phytochemical Analysis* **2014**. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.2532/references>.
- Penttilä, A.; Fales, H. M. *Chemical Communications* **1966**, 18, 656-657.
- Perry, N. B.; Benn, M. H.; Brennan, N. J.; Burgess, E. J.; Ellis, G.; Galloway, D. J.; Lorimer, S. D.; Tangney, R. S. *The Lichenologist* **1999**, 31 (6), 627-636.
- Pires, R. H.; Lucarini, R.; Mendes-Giannini, M. J. S. *Antimicrobial and Agents and Chemotherapy* **2012**, 56 (1), 595-597.
- Plsíková, J.; Stepankova, J.; Kasparkova, J.; Brabec, V.; Backor, M.; Kozurkova, M. *Toxicology in Vitro* **2014**, 28, 182-186.
- Podterob, A. P. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **2008**, 42 (10), 582-588.
- Polónia, M. A.; Carneiro, A. F.; Pinto, M. M. M. *Journal of Liquid Chromatography* **1991**, 14 (8), 1447-1452.
- Polovinka, M. P.; Komarova, N. I.; Korchagina, D. V.; Sokolov, D. N.; Luzina, O. A.; Vlasenko, N. G.; Malyuga, A. A.; Romanova, E. V.; Salakhutdinov, N. F. *Chemistry of Natural Compounds* **2012**, 48 (3), 392-395.
- Portella, C.; Afonso, C. M. M.; Pinto, M. M. M.; Lopes, D.; Nogueira, F.; do Rosário, V. *Chemistry & Biodiversity* **2007**, 4, 1508-1519.
- Prashith Kekuda, T. R.; Syed, J.; Dileep, N.; Rakesh, K. N.; Vinayaka, K. S. *Science, Technology and Arts Research Journal* **2013**, 2 (4), 87-90.
- Promptoon, P.; Bhumiratana, A.; Ruchirawat, S.; Boucias, D. G.; Wiwat, C. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2008**, 24, 2909-2917.
- Proška, B.; Šturdíková, M.; Prónayová, N.; Liptaj, T. *Pharmazie* **1996**, 51 (3), 195-196.
- Purvis, O. W. *Botanical Studies* **2014**, 55, 23-36.
- Quilhot, W.; Fernández, E.; Rubio, C.; Goddard, M.; Hidalgo, M. E. In: Marcelli M, Seaward RDH (eds) *Lichenology in Latin America: history, current knowledge and applications. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo* **1998**, 171-179.
- Quilhot, W.; Leighton, G.; Flores, E.; Fernández, E.; Peña, W.; Guzmán, G. *Acta Farmaceutica Bonaerense* **1987**, 6, 15-22.

- Quilhot, W.; Peña, W.; Flores, E.; Hidalgo, M. E.; Fernández, E.; Leighton, G. *Instituto Antartico Chileno* **1991b**, Chile, 99-106.
- Quilhot, W.; Sagredo, M. G.; Campalans, E.; Hidalgo, M. E.; Peña, W.; Fernández, E.; Piovano, M. *Instituto Antartico Chileno* **1991a**, Chile, 91-97.
- Quillinan, A. J.; Scheinmann, F. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1973**, 1329-1337.
- Ragasa, C. Y.; Crisostomo, C. J. J.; Garcia, K. D. C.; Shen, C.-C. *The Philippine Scientist* **2010**, 47, 63-75.
- Raistrick, H.; Robinson, R.; White, D. E. *Biochemical Journal* **1936**, 30 (8), 1303-1314.
- Ramos, D. F.; Almeida da Silva, P. E. *Pharmaceutical Biology* **2010**, 48 (3), 260-263.
- Rancan, F.; Rosan, S.; Boehm, K.; Fernández, E.; Hidalgo, M. E.; Quihot, W.; Rubio, C.; Boehm, F.; Piazena, H.; Oltmanns, U. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2002**, 68, 133-139.
- Ranković, B.; Kosanić, M. M.; Manojlović, N.; Rančić, A.; Stanojković, T. *Medicinal Chemistry Research* **2014**, 23, 408-416.
- Ranković, B.; Mišić, M.; Sukdolak, S. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2008**, 24, 1239-1242.
- Ranković, B.; Mišić, M. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2008**, 22 (4), 1013-1016.
- Ranković, B.; Mišić, M.; Sukdolak, S. *Biologia* **2009**, 64 (1), 53-58.
- Ravinskaya, A. P. In: Golubkova, N.S. (ed.), The problems of experimental Lichenology in the USSR, *Komarov Botanical Institute, Leningrad, USSR Academy of Sciences* **1991**, 93-98.
- Rawat, M. S. M.; Shukla, V.; Negi, S.; Pant, G. *Indian Journal of Chemistry* **2006**, 45B, 2566-2570.
- Reininger, W.; Hartl, A. US Patent 4053517, **1977**.
- Renault, E. *Délicatification du bois de châtaignier par une approche de chimie verte. Mise en oeuvre et impacts sur la structure et le potentiel anti-radicalaire des phyto-polysaccharides extraits*. These de doctorat, Université de Limoges, **2014**.
- Reutimann, P.; Scheidegger, C. *Journal of Chemical Ecology* **1987**, 13 (2), 363-369.
- Řezanka, T.; Jáchymová, J.; Dembitsky, V. M. *Phytochemistry* **2003**, 62, 607-612.
- Řezanka, T.; Sigler, K. *Journal of Natural Products* **2007**, 70, 1487-1491.
- Řezanka, T.; Temina, M.; Tolstikov, A. G.; Dembitsky, V. M. *Folia Microbiologica* **2004**, 49 (4), 339-352.
- Richardson, D. H. S. *Canadian Journal of Botany* **2002**, 80, 101-113.
- Rios, J.L.; Recio, M. C.; Villar, A. *Journal of Ethnopharmacology* **1988**, 23, 127-149.
- Robertson, A.; Whalley, W. B. *Journal of the Chemical Society* **1951**, 3355-3356.
- Romagni, J. G.; Dayan, F. E. *Advances in Microbial Toxin Research and Its Biotechnological Exploitation* R.K. Upadhyay (Ed.) **2002**, 151-169.
- Romagni, J. G. *Chemical Ecology* **2009**, 1, 393-415.
- Roullier, C.; Chollet-Krugler, M.; Bernard, A.; Boustie, J. *Journal of Chromatography B* **2009**, 877, 2067-2073.
- Roullier, C.; Chollet-Krugler, M.; Pferschy-Wenzig, E.-M.; Maillerd, A.; Rechberger, G. N.; Legouin-Gargadennec, B.; Bauer, R.; Boustie, J. *Phytochemistry* **2011**, 72, 1348-1357.
- Rowe, J. G.; Saenz, M. T.; Garcia, M. D. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **1989**, 47 (2), 89-94.
- Rubio, C.; Fernández, E.; Hidalgo, M. E.; Quilhot, W. *Boletín de la SocieUVBD Chilena de Química* **2002**, 47, 213-217.

- Rundel, P. W. *The Bryologist* **1969**, 72, 40-44.
- Rundel, P. W. *Biochemical Systematics and Ecology* **1978**, 6, 157-170.
- Russo, A.; Piovano, M.; Lombardo, L.; Garbarino, J.; Cardile, V. *Life Sciences* **2008**, 83, 468-474.
- Rycroft, D. S.; Connolly, J. D.; Huneck, S.; Himmelreich, U. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* **1995**, 50 (10), 1557-1563.
- Sahu, S. C.; Amankwa-Sakyi, M.; O'Donnell Jr, M. W.; Sprando, R. L. *Journal of Applied Toxicology* **2012**, 32 (9), 722-730.
- Saklani, A.; Upreti, D. K. *Journal of Ethnopharmacology* **1992**, 37 (3), 229-33.
- Sala, T.; Sargent, M. V. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1981**, 0, 877-882.
- Sanchez, W.; Maple, J. T.; Burgart, L. J.; Kamath, P. S. *Mayo Clinic Proceedings* **2006**, 81 (4), 541-544.
- Sancho, L. G.; Green, T. G. A.; Pintado, A. *Flora* **2007**, 202, 667-673.
- Sancho, L. G.; Pintado, A. *Polar Biology* **2004**, 27, 312-319.
- Santesson, J. *Acta Chemica Scandinavica* **1968**, 22, 2393-2393.
- Santiago, K. A. A.; Borricano, J. N. C.; Canal, J. N.; Marcelo, D. M. A.; Perez, M. C. P.; Cruz, T. E. E. *Philippines Sciences Letters* **2010**, 3 (2), 18-29.
- Santos, N. P.; Nascimento, S. C.; Silva, J. F.; Pereira, E. C. G.; Silva, N. H.; Honda, N. K.; Santos-Magalhães, N. S. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2005**, 15 (5), 355-361.
- Sargent, M. V. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1987**, 231-235.
- Sassa, T.; Igarashi, M. *Agricultural and Biological Chemistry* **1990**, 54 (9), 2231-2237.
- Sato, S.; Obara, H.; Onodera, J.-I.; Endo, A.; Matsuba, S. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1992**, 65 (2), 452-457.
- Sato, S.; Nojiri, T.; Onodera, J.-I. *Carbohydrate Research* **2005**, 340, 389-393.
- Schmeda-Hirschmann, G.; Tapia, A.; Lima, B.; Pertino, M.; Sortino, M.; Zacchino, S.; Rojas de Arias, A.; Feresin, G. *E. Phytotherapy Research* **2008**, 22, 349-355.
- Scirpa, P.; Scambia, G.; Masciullo, V.; Battaglia, F.; Foti, E.; Lopez, R.; Villa, P.; Malecore, M.; Mancuso, S. *Minerva Ginecologica* **1999**, 51 (6), 255-260.
- Seaward, M. R. D. *International Biodeterioration & Biodegradation* **1997**, 40 (2-4), 269-273.
- Seifert, P.; Bertram, C. *Seifen, Öle, Fette, Wachse* **1995**, 121 (7), 480-485.
- Shah, H. A.; Shah, R. C. *Journal of the Chemical Society* **1939**, 949-951.
- Sharma, S. K.; Agarwal, D. D. *International Journal of Scientific and Research Publications* **2014**, 4 (7), 1-18.
- Sharma, A. K.; Sharma, M. C.; Dobhal, M. P. *Der Chemica Sinica* **2013**, 4 (1), 1-11.
- Shibata, S. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **1941**, 61, 320-325.
- Shibata, S.; Miura, Y. *The Japanese Medical Journal* **1949**, 2, 22-24.
- Shinji, C.; Maeda, S.; Imai, K.; Yoshida, M.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, 7625-7651.
- Shoji, J. *chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1962**, 10, 483-491.
- Shrestha, G.; St Clair, L. L. *Phytochemistry Reviews* **2013**, 12, 229-244.
- Shukla, V.; Pant Joshi, G.; Rawat, M. S. M. *Phytochemistry Reviews* **2010**, 9, 303-314.

- Siddiki, A. A.; Takale, B. S.; Telvekar, V. N. *Tetrahedron Letters* **2013**, 54, 1294-1297.
- Sigurbjörnsdóttir, M. A.; Heiðmarsson, S.; Jónsdóttir, A. R.; Vilhelmsson, O. *Canadian Journal of Microbiology* **2014**, 60 (5), 307-317.
- Singh, A.; Choi, R.; Choi, B.; Koh, J. *Dyes and Pigments* **2012**, 95, 580-586.
- Šmejlková, D.; Piccolo, A. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2120-2125.
- Šmejlková, D.; Piccolo, A. *Environmental Science & Technology* **2006**, 40, 1644-1649.
- Smith, K.; Butters, M.; Paget, W. E.; Goubet, D.; Fromentin, E.; Nay, B. *Green Chemistry* **1999**, 1, 83-90.
- Sokolov, D. N.; Luzina, O. A.; Polovinka, M. P.; Salakhutdinov, N. F. *Chemistry of Natural Compounds* **2011**, 47 (2), 203-205.
- Sokolov, D. N.; Luzina, O. A.; Salakhutdinov, N. F. *Russian Chemical Reviews* **2012a**, 81 (8), 747-768.
- Sokolov, D. N.; Rakhmanova, M. E.; Luzina, O. A.; Shernyukov, A. V.; Salakhutdinov, N. F. *Russian Chemical Bulletin, International Edition* **2013**, 62 (1), 212-216.
- Sokolov, D. N.; Zarubaev, V. V.; Shtro, A. A.; Polovinka, M. P.; Luzina, O. A.; Komarova, N. I.; Salakhutdinov, N. F.; Kiselev, O. I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012b**, 22, 7060-7064.
- Solberg, Y. J. *The Lichenologist* **1970**, 4, 271-282.
- Solhaug, K. A.; Gauslaa, Y. *Oecologia* **1996**, 108, 412-418.
- Solhaug, K. A.; Gauslaa, Y.; Nybakken, L.; Bilger, W. *New Phytologist* **2003**, 158, 91-100.
- Solhaug, K. A.; Larsson, P.; Gauslaa, Y. *Planta* **2010**, 231, 1003-1011.
- Song, J.; Feng, R. X.; Chen, L.; Wang, J. B.; Shi, W.; Wang, K. *Transactions of Tianjin University* **2002**, 8, 37-39.
- Song, Y.; Dai, F.; Zhai, D.; Dong, Y.; Zhang, J.; Lu, B.; Luo, J.; Liu, M.; Yi, Z. *Angiogenesis* **2012**, 15, 421-432.
- Song, X.-Q.; Zhang, X.; Han, Q.-J.; Li, X.-B.; Li, G.; Li, R.-J.; Jiao, Y.; Zhou, J.-C.; Lou, H.-X. *Phytochemistry Letters* **2013**, 6, 318-321.
- Soviar, K.; Motl, O.; Samek, Z.; Smolíková, J. *Tetrahedron Letters* **1967**, 24, 2277-2279.
- Stenroos, S.; Stocker-Wörgötter, E.; Yoshimura, I.; Myllys, L.; Thell, A.; Hyvönen, J. *Canadian Journal of Botany* **2003**, 81, 237-242.
- Stocker-Wörgötter, E. *Bulletin de la Société Botanique de France - Lettres botaniques* **1991**, 138, 179-187.
- Stocker-Wörgötter, E. *Natural Product Reports* **2008**, 25, 188-200.
- Stocker-Wörgötter, E.; Mach Cortes Cordeiro, L.; Lacomini, M. *Studies in Natural Products Chemistry* **2013**, 39, 337-380.
- Stojanović, G.; Stojanović, I.; Šmelcerović, A. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2012**, 9, 178-184.
- Su, C.; Li, X.-N.; Zhang, Q.-F.; Ma, L.; Lu, C.-S.; Feng, F. *Chinese Chemical Letters* **2013**, 24, 59-62.
- Sultana, N.; Afolayan, A. J. *Journal of Asian Natural Products Research* **2011**, 13 (12), 1158-1164.
- Sundset, M. A.; Barboza, P. S.; Green, T. K.; Folkow, L. P.; Schytte Blix, A.; Mathiesen, S. D. *Naturwissenschaften* **2010**, 97, 273-278.
- Susithra, E.; Mallikarjuna Rao, K.; Ramseshu, K. V.; Meena, S. *Journal of Pharmacy Research* **2011**, 4 (2), 352-355.
- Taguchi, H.; Sankawa, U.; Shibata, S. *Tetrahedron Letters* **1966**, 42, 5211-5214.
- Tanemura, K.; Suzuki, T.; Nishida, Y.; Satsumabayashi, K.; Horaguchi, T. *Chemistry Letters* **2003**, 32 (10), 932-933.

- Tang, C.; Jiao, N. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, 18924–18927.
- Tavares, R. S.; Martins, F. C.; Oliveira, P. J.; Ramalho-Santos, J.; Peixoto, F. P. *Reproductive Toxicology* **2009**, 27, 1-7.
- Thadhani, V. M.; Choudhary, M. I.; Ali, S.; Omar, I.; Siddique, H.; Karunaratne, V. *Natural Product Research* **2011**, 25 (19), 1827-1837.
- Thormann, M. N. *The Forestry Chronicle* **2006**, 82 (3), 335-343.
- Timdal, E. *Graphis Scripta* **1989**, 2, 125-127.
- Tønsberg, T. *Graphis Scripta* **1995**, 7, 61-66.
- Torres, A.; Hochberg, M.; Pergament, I.; Smoum, R.; Niddam, V.; Dembitsky, V. M.; Temina, M.; Dor, I.; Lev, O.; Srebnik, M.; Enk, C. D. *European Journal of Biochemistry* **2004**, 271, 780-784.
- Türk, H.; Yılmaz, M.; Tay, T.; Türk, A. O.; Kıvanç, M. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* **2006**, 61c, 499-507.
- Ullmann, F.; Panchaud, L. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1906**, 350 (1-2), 108-117.
- U'Ren, J. M.; Lutzoni, F.; Miadlikowska, J.; Laetsch, A. D.; Arnold, A. E. *American Journal of Botany* **2012**, 99 (5), 898-914.
- Van Haluwyn, C. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **1999**, 57, 448-454.
- Van Haluwyn, C.; Asta, J.; Gavériaux J.-P., Guide des lichens de France : lichens des arbres. **2009**, Belin (Ed.) 231 p.
- Van Haluwyn, C.; Lerond, M., Guide des lichens **1993**. Lechevalier (Ed.) 376 p.
- Variati, R. *Olaj, Szappan, Kozmetika* **2010**, 59 (1), 11-16.
- Varvaresou, A.; Papageorgiou, S.; Tsiarivas, E.; Protopapa, E.; Kintziou, H.; Kefala, V.; Demetzos, C. *International Journal of Cosmetic Science* **2009**, 31, 163-175.
- Veitch, N. C. *Phytochemistry* **2004**, 65, 249-259.
- Verma, N.; Behera, B. C.; Parizadeh, H.; Sharma, B. O. *International Journal of Drug Development & Research* **2011**, 3 (3), 222-232.
- Verma, N.; Behera, B. C.; Sharma, B. O. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* **2012**, 40 (1), 7-21.
- Vidossich, P.; Magistrato, A. *Biomolecules* **2014**, 4, 616-645.
- Vieira, L. M. M.; Kijjoa, A. *Current Medicinal Chemistry* **2005**, 12, 2413-2446.
- Vijayakumar, C. S.; Viswanathana, S.; Kannappa Reddy, M.; Parvathavarthinia, S.; Kundub, A. B.; Sukumar, E. *Fitoterapia* **2000**, 71, 564-566.
- Vila, J.; Mollinedo, P.; Sterner, O. *Revista Boliviana de Química* **2011**, 28 (1), 28-34.
- Vo, T. T. B.; Jung, E.-M.; Choi, K.-C.; Yu, F. H.; Jeung, E.-B. *Steroids* **2011**, 76, 675-681.
- Vo, T. T. B.; Yoo, Y.-M.; Choi, K.-C.; Jeung, E.-B. *Reproductive Toxicology* **2010**, 29, 306-316.
- Vráblíková, H.; McEvoy, M.; Solhaug, K. A.; Barták, M.; Gauslaa, Y. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2006**, 83, 151-162.
- Vyas, P. V.; Bhatt, A. K.; Ramachandraiah, G.; Bedekar, A. V. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 4085-4088.
- Wang, B.-D.; Yang, Z.-Y.; Qin, D.-D.; Chen, Z.-N. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2008**, 194, 49-58.
- Wojciechowski, Z. A.; Goad, L. J.; Goodwin, T. W. *Phytochemistry* **1973**, 12, 1433-1436.

- Wu, J.; Zhang, M.; Ding, D.; Tan, T.; Yan, B. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases* **1995**, 13 (2), 126-129.
- Xang, X. Y.; Wei, X. L.; Luo, H.; Kim, J. A.; Jeon, H. S.; Koh, Y. J.; Hur, J.-S. *Mycobiology* **2010**, 38 (3), 176-179.
- Yamamoto, Y.; Miura, Y.; Kinoshita, Y.; Higuchi, M.; Yamada, Y.; Murakami, A.; Ohigashi, H.; Koshimizu, K. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1995**, 43 (8), 1388-1390.
- Yang, C.-H.; Ma, L.; Wei, Z. P.; Han, F.; Gao, J. *Chinese Herbal Medicines* **2012**, 4 (2), 87-102.
- Yaoita, Y.; Matsuki, K.; Iijima, T.; Nakano, S.; Kakuda, R.; Machida, K.; Kikuchi, M. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2001**, 49 (5), 589-594.
- Yılmaz, M.; Türk, A. O.; Tay, T.; Kivanç, M. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* **2004**, 59c, 249-254.
- Yılmaz, M.; Tay, T.; Kivanç, M.; Türk, H.; Türk, A. O. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* **2005**, 60c, 35-38.
- Yoshikawa, K.; Kokudo, N.; Tanaka, M.; Nakano, T.; Shibata, H.; Aragaki, N.; Higuchi, T.; Hashimoto, T. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2008**, 56 (1), 89-92.
- Yoshimura, I.; Kinoshita, Y.; Yamamoto, Y.; Huneck, S.; Yamada, Y. *Phytochemical Analysis* **1994**, 5, 197-205.
- Yuan, X.; Xiao, S.; Taylor, T. N. *Science* **2005**, 308, 1017-1020.
- Yücel, O.; Odabaşoğlu, F.; Güllüce, M.; Çalik, Z. Z.; Çakir, A.; Aslan, A.; Yazici, K.; Halici, M. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, 4 (2), 101-109.
- Zambare, V. P.; Christopher, L. P. *Pharmaceutical Biology* **2012**, 50 (6), 778-798.
- Zhang, S.; Adamson, D. H.; Prud'homme, R. K.; Link, A. J. *Polymer Chemistry* **2011**, 2, 665-671.
- Zhao, Y.; Wang, H.; Liu, T.; Xin, Z. *European Food Research and Technology* **2014**, 238, 621-633.
- Zou, Y.; Zhao, Q.; Hu, H.; Hu, L.; Yu, S.; Xu, M.; Wu, Q. *Archives of Pharmacal Research* **2012**, 35 (12), 2093-2104.

ANNEXES

DIEU Amandine | Thèse de Doctorat Chimie des Substances Naturelles | Université de Limoges | 2015

291

Préambule

FR

2. Tous les produits finis contenant du formaldéhyde ou des substances de la présente annexe et libérant du formaldéhyde doivent reprendre obligatoirement sur l'étiquetage la mention «Contient: Formaldéhyde» dans la mesure où la concentration en formaldéhyde dans le produit fini dépasse 0,05 %.

Journal officiel de l'Union européenne
22.12.2009

Identification des substances			Conditions				Libellé des conditions d'emploi et des avertissements	
Numéro d'ordre	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi		Autres
a	b	c	d	e	f	g	h	i
2	Acide propionique et ses sels	Propionic acid, ammonium propionate, calcium propionate, magnesium propionate, potassium propionate, sodium propionate	79-09-4, 17496-08-1, 4075-81-4, 557-27-7, 327-62-8, 137-40-6	201-176-3, 241-503-7, 223-795-8, 209-166-0, 206-323-5, 205-290-4		2 % (acide)		
3	Acide salicylique (1) et ses sels	Salicylic acid, calcium salicylate, magnesium salicylate, MEA-salicylate, sodium salicylate, potassium salicylate, TEA-salicylate	69-72-7, 824-35-1, 18917-89-0, 59866-70-5, 54-21-7, 578-36-9, 217416-5	200-712-3, 212-525-4, 242-669-3, 261-963-2, 200-198-0, 209-421-6, 218-531-3		0,5 % (acide)	Ne pas utiliser dans les produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, à l'exception des shampoings	Ne pas employer chez les enfants de moins de 3 ans (2)
4	Acide sorbique et ses sels	Sorbic acid, calcium sorbate, sodium sorbate, potassium sorbate	110-44-1, 7492-55-9, 7757-81-5, 24634-61-5	203-768-7, 231-321-6, 231-819-3, 246-376-1		0,6 % (acide)		
5	Formaldéhyde et paraformaldéhyde (3)	Formaldéhyde Paraformaldéhyde	50-00-0, 30525-89-4	200-001-8	Produits bucco-dentaires Autres produits	0,1 % (en formaldéhyde libre) 0,2 % (en formaldéhyde libre)	Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays)	
6	Déplacé ou supprimé							
7	Biphényle-2-ol et ses sels	o-Phenylphenol, sodium o-phenylphenate, potassium o-phenylphenate, MEA o-phenylphenate	90-43-7, 132-27-4, 13707-65-8, 84145-04-0	201-993-5, 205-055-6, 237-243-9, 282-227-7		0,2 % (en phénol)		
8	Pyrithione de zinc (4)	Zinc pyrithione	13463-41-7	236-671-3	Produits pour les cheveux et la pilosité du visage Autres produits	1,0 % 0,5 %	Uniquement pour les produits à rincer Ne pas utiliser dans les produits bucco-dentaires	

22.12.2009

FR

Journal officiel de l'Union européenne

L 342/193



		Identification des substances				Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
Numéro d'ordre	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres		
a	b	c	d	e	f	g	h	i	
9	Sulfites et bisulfites inorganiques (*)	Sodium sulfite, ammonium bisulfite, ammonium sulfite, potassium sulfite, potassium hydrogène sulfite, sodium bisulfite, sodium metabisulfite, potassium metabisulfite	7757-83-7, 10192-30-0, 10196-04-0, 10117-38-1, 7773-03-7, 7631-90-5, 7681-57-4, 16731-55-8	231-821-4, 233-469-7, 233-484-9, 233-321-1, 231-870-1, 231-548-0, 231-673-0, 240-795-3		0,2 % (en SO ₂ libre)			
10	Déplacé ou supprimé								
11	1,1,1-Trichloro-2-méthylpropanol-2 (Chlorobutanol)	Chlorobutanol	57-15-8	200-317-6		0,5 %	Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays)	Contient: Chlorobutanol	
12	Acide p-hydroxybenzoïque, ses sels et esters	4-Hydroxybenzoic acid, methylparaben, butylparaben, potassium ethylparaben, potassium propylparaben, isobutylparaben, sodium methylparaben, sodium ethylparaben, sodium propylparaben, sodium isobutylparaben, ethylparaben, sodium butylparaben, sodium isobutylparaben, isopropylparaben, potassium methylparaben, potassium butylparaben, potassium propylparaben, sodium propylparaben, calcium paraben, phenylparaben	99-96-7, 99-76-3, 94-26-8, 36457-19-9, 16782-08-4, 94-13-3, 4247-02-3, 5026-62-0, 35285-68-8, 35285-69-9, 36457-20-2, 84930-15-4, 120-47-8, 114-63-6, 4191-73-5, 2611-07-2, 38566-94-8, 84930-17-4, 35285-69-9, 69959-44-0, 17696-62-7	202-804-9, 202-785-7, 202-318-7, 253-048-1, 240-830-2, 202-307-7, 224-208-8, 225-714-1, 252-487-6, 252-488-1, 253-049-7, 284-595-4, 204-399-4, 204-051-1, 224-069-3, 247-464-2, 254-009-1, 284-597-5, 252-488-1, 274-235-4, 241-698-9		0,4 % (en acide) pour un ester 0,8 % (en acide) pour les mélanges d'esters			
13	Acide déhydroacétique et ses sels	Dehydroacetic acid, sodium dehydroacetate	520-45-6, 4418-26-2, 16807-48-0	208-293-9, 224-580-1		0,6 % (en acide)	Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays)		
14	Acide formique et son sel de sodium	Formic acid, sodium formate	64-18-6, 141-53-7	200-579-1, 205-488-0		0,5 % (en acide)			



Identification des substances		Conditions				Libellé des conditions d'emploi et des avertissements		
Numéro d'ordre	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
15	1,6-Di (4-amidino-2-bromophénoxy)-n-hexane (Dibromohexamidine) et ses sels (y compris l'isethionate)	Dibromohexamidine Isethionate	93856-83-8	299-116-4		0,1 %		
16	Thiosalicylate d'éthylmercure sodique (Thiomersal)	Thimerosal	54-64-8	200-210-4	Produits les yeux	0,007 % (en Hg) En cas de mélange avec d'autres composés mercuriels autorisés par le présent règlement, la concentration maximale en Hg restreinte fixée à 0,007 %		Contient Thio-salicylate d'éthyl-mercure sodique
17	Phénylmercure et ses sels (y compris le borate)	Phenyl Mercuric Acetate, Phenyl Mercuric Benzoate	62-38-4, 94-43-9	200-532-5, 202-331-8	Produits pour les yeux	0,007 % (en Hg) En cas de mélange avec d'autres composés mercuriels autorisés par le présent règlement, la concentration maximale en Hg restreinte fixée à 0,007 %		Contient des composés phé-nylmercuriques
18	Acide undécylénique et ses sels	Undecylenic acid, potassium undecylenate, sodium undecylenate, calcium undecylenate, TEA-undecylenate, MEA-undecylenate	112-38-9, 6159-41-7, 3398-33-2, 1322-14-1, 84471-25-0, 56532-40-2	203-965-8, 222-264-8, 215-331-8, 282-908-9, 260-247-7		0,2 % (en acide)		
19	1,3-bis(2-éthylhexyl)hexahydro-5-méthyl-5-pyrimidinamine	Hexetidine	141-94-6	205-513-5		0,1 %		

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions		Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	
a	b	c	d	e	f	g	h
20	Bromo-5-nitro-5 dioxane 1,3	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane	30007-47-7	250-001-7	Produits à rincer	0,1 %	Éviter la formation de nitrosamines
21	Bromo-2 nitro-2 propanediol 1,3 (Bromopol)	2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol	52-51-7	200-143-0		0,1 %	Éviter la formation de nitrosamines
22	Alcool dichloro-2,4-benzylrique	Dichlorobenzyl Alcohol	1777-82-8	217-210-5		0,15 %	
23	1-(4-Chlorophényl)-3-(3,4-dichlorophényl)urée (9)	Triclocarban	101-20-2	202-924-1		0,2 %	Critères de pureté: 3,3'-4,4'-Tétrachloroazobenzène < 1 ppm 3,3'-4,4'-Tétrachloroazoxybenzène < 1 ppm
24	Chlorocresol	p-Chloro-m-Cresol	59-50-7	200-431-6	Ne pas utiliser dans les produits destinés aux muqueuses	0,2 %	
25	5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy) phénol	Triclosan	3380-34-5	222-182-2		0,3 %	
26	Chloroxyénol	Chloroxyénol	88-04-0	201-793-8		0,5 %	
27	N,N'-Méthylènebis[N'-(3-(hydroxyméthyl)-2,5-dioximidazolidine-4-yl)urée]	Imidazolidinyl urée	39236-46-9	254-372-6		0,6 %	
28	α, ω-bis [[(Aminométhylamino)iminométhyl] amino-poly(méthylène), dichlorhydrate	Polyaminopropyl biguanide	70170-61-5, 28757-47-3, 133029-32-0			0,3 %	
29	Phénoxy-2-éthanol	Phenoxyethanol	122-99-6	204-589-7		1,0 %	
30	Méthénamine	Methenamine	100-97-0	202-905-8		0,15 %	



Numéro d'ordre	Identification des substances					Conditions		Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
31	Chlorure de 1-(3-chloroallyl)-3,5,7-triaza-1-azonia adamantane	Quaternium-15	4080-31-3	223-805-0		0,2 %		
32	1-Imidazolyl-1-(4-chlorophénoxy) 3,3-diméthylbutane-2-one	Climbazole	38083-17-9	253-775-4		0,5 %		
33	Diméthylol, diméthylhydantoïne	DMDM Hydantoïn	6440-58-0	229-222-8		0,6 %		
34	Alcool benzylque (?)	Benzyl alcohol	100-51-6	202-859-9		1,0 %		
35	1-Hydroxy-4-méthyl-6 (2,4,4-triméthyl-pentyl) 2-pyridon et son sel de monoéthanol amine	1-Hydroxy-4-méthyl-6-(2,4,4-triméthylpentyl) 2-pyridon, Proctone Olanine	50650-76-5, 68890-66-4	272-574-2	Produits à rincer	1,0 %		
					Autres produits	0,5 %		
36	Déplacé ou supprimé							
37	2,2'-Méthylènebis(6-bromo-4-chlorophénol)	Bromochlorophene	15435-29-7	239-446-8		0,1 %		
38	Isopropyl-métacrésol	o-Cymen-5-ol	3228-02-2	221-761-7		0,1 %		
39	Chloro-5-méthyl-2-isothiazoline-4-one-3 + méthyl-2-isothiazoline-4-one-3 + du chlorure de magnésium et du nitrate de magnésium	Méthylchloroisothiazolinone et Méthylisothiazolinone	26172-55-4, 2682-20-4, 55965-84-9	247-500-7, 220-239-6		0,0015 % (d'un mélange dans un rapport 3:1 de chloro-5-méthyl-2-isothiazoline-4-one-3 et méthyl-2-isothiazoline-4-one-3)		
40	Benzyl-2-chloro-4-phénol	Chlorophene	120-32-1	204-385-8		0,2 %		
41	Chloracétamide	Chloroacétamide	79-07-2	201-174-2		0,3 %		Contient Chlo-roacétamide

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions		
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres
a	b	c	d	e	f	g	h
42	N,N'-bis(4-Chlorophényl)-3,12-dimino-2,4,1,1,3-tétrazatétradécane diamidine acétate, gluconate et chlorhydrate	Chlorhexidine, Chlorhexidine Diacétate, Chlorhexidine Digluconate, Chlorhexidine Dihydrochloride	55-56-1, 56-95-1, 18472-51-0, 3697-42-5	200-238-7, 200-302-4, 242-354-0, 223-026-6		0,3 % (en chlorhexidine)	
43	Phénoxypropanol (*)	Phenoxyisopropanol	770-35-4	212-222-7	Uniquement pour les produits à rinçer	1,0 %	
44	Allyl (C ₁₂₋₂₂) triméthyl ammonium, bromure de, chlorure de	Behentrimonium chloride, cetrimonium bromide, cetrimonium chloride, laurtrimonium bromide, laurtrimonium chloride, steartrimonium bromide, steartrimonium chloride	17301-53-0, 57-09-0, 112-02-7, 1119-94-4, 112-00-5, 1120-02-1, 112-03-8	241-327-0, 200-311-3, 203-928-6, 214-290-3, 203-927-0, 214-294-5, 203-929-1		0,1 %	
45	4,4-Diméthyl-1,3-oxazolidine	Dimethyl Oxazolidine	51200-87-4	257-048-2		0,1 %	pH > 6
46	N-(Hydroxyméthyl)-N-(dihydroxyméthyl)-1,3-dioxo-2,5-imidazolidinyl-4)-N-(hydroxyméthyl) urée	Diazolidinyl Urea	78491-02-8	278-928-2		0,5 %	
47	4,4'-(1,6-Hexanediybis(oxy))bis-benzencarboximidamide et ses sels (incluant l'iséthionate et le p-hydroxybenzoate)	Hexamidine, Hexamidine diiséthionate, Hexamidine paraben	3811-75-4, 659-40-5, 93841-83-9	211-533-5, 299-055-3		0,1 %	
48	Glutaraldéhyde (1,5-pentandial)	Glutaral	111-30-8	203-856-5		0,1 %	Ne pas utiliser dans les sols (sprays)
49	5-Éthyl-3,7-dioxa-1-azabicyclo [3,3,0] octane	7-Ethylbicyclooxazolidine	7747-35-5	231-810-4		0,3 %	Ne pas utiliser dans les produits bucco-dentaires et dans les produits destinés aux muqueuses

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions		Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	
a	b	c	d	e	f	g	h
50	3- <i>p</i> -Chlorophénoxy)-propane-1,2 diol	Chlorophensin	104-29-0	203-192-6		0,3 %	
51	Hydroxyméthylaminoacétate de sodium	Sodium Hydroxyméthylglycinate	70101-44-3	274-357-8		0,5 %	
52	Chlorure d'argent déposé sur dioxyde de titane	Silver chloride	7783-90-6	232-033-3		0,004 % (en AgCl)	20 % AgCl (m/m) sur TiO ₂ . Ne pas utiliser dans les produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, dans les produits bucco-dentaires et dans les produits pour les yeux ou les lèvres
53	Chlorure de N,N-diméthyl-N'-(2-[2-(4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénoxy)éthoxy]éthyl) benzène-méthaniminium	Benzethonium Chloride	121-54-0	204-479-9	a) Produits à rincer b) Produits sans rinçage autres que les produits bucco-dentaires	0,1 %	
54	Chlorure, bromure et saccharinate de benzalkonium (¹⁹)	Benzalkonium chloride, benzalkonium bromide, benzalkonium saccharinate	8001-54-5, 63449-41-2, 91080-29-4, 68989-01-5, 68424-85-1, 68391-01-5, 61789-71-7, 85409-22-9	264-151-6, 293-522-5, 273-545-7, 270-325-2, 269-919-4, 263-080-8, 287-089-1		0,1 % (en chlorure de benzalkonium)	Éviter le contact avec les yeux
55	(Phénylméthoxy) méthanol	Benzylhemiformal	14548-60-8	238-588-8	Produits à rincer	0,15 %	

22.12.2009

FR

Journal officiel de l'Union européenne

L 342/199



Identification des substances		Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements			
Numéro d'ordre	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE		Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres
a	b	c	d	e	f	g	h	i
56	Carbamate de 3-iodo-2-propenylbutyle	Iodopropenyl butylcarbamate	55406-53-6	259-627-5	a) Produits à rincer b) Produits sans rinçage c) Déodorants/antiperspirants	a) 0,02 % b) 0,01 % c) 0,0075 %	Ne pas utiliser pour les produits bucco-dentaires et les produits pour les lèvres a) Ne pas utiliser dans des produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, sauf dans des produits de bain/gels de douche et des shampooings b) Ne pas utiliser dans les lotions et crèmes pour le corps (19) b) et c) Ne pas utiliser dans des produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans	a) Ne pas utiliser pour des enfants âgés de moins de 3 ans (11) b) et c) Ne pas utiliser pour des enfants âgés de moins de 3 ans (17)
57	2-Méthyl-2H-isothiazole-3-one	Methylisothiazolinone	2682-20-4	220-239-6		0,01 %		

(1) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 98.

(2) Uniquement pour les produits qui pourraient éventuellement être utilisés chez les enfants âgés de moins de 3 ans et qui restent en contact prolongé avec la peau.

(3) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 13.

(4) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 101.

(5) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 99.

(6) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 100.

(7) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 45 et 68.

(8) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 54.

(9) Seulement si la concentration dépasse 0,05 %.

(10) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 65.

(11) Uniquement pour les produits, autres que les produits de bain/gels de douche et shampooings, susceptibles d'être utilisés pour des enfants âgés de moins de 3 ans.

(12) Uniquement pour les produits susceptibles d'être utilisés pour des enfants âgés de moins de 3 ans.

(13) Concerne tous les produits destinés à être appliqués sur une partie étendue du corps.

Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique

Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique de deux composés actifs

Résumé : L'étude phytochimique de trois lichens récoltés en Limousin, *Usnea florida*, *Flavoparmelia caperata* et *Cladonia incrassata*, a permis d'isoler et de caractériser 16 composés issus du métabolisme secondaire. Dans un premier temps, ces lichens ont été sélectionnés lors d'un criblage analytique préliminaire réalisé sur 17 espèces. L'activité antimicrobienne des extraits acétoniques a été évaluée, puis leur fractionnement bioguidé a été mis en œuvre. Les deux isomères de l'acide usnique, 3 dibenzofuranes, 4 depsides, 3 depsidones, un acide aliphatique, un phtalide et un stérol ont été isolés. Une xanthone trichlorée, la cladoxanthone A, a été extraite et identifiée pour la première fois à partir d'une source naturelle. L'effet de tous les composés a été évalué sur *Staphylococcus aureus* par bioautographie. Pour les produits isolés en quantité suffisante, des tests de dilution en milieu liquide ont permis de déterminer leurs CMI, en comparaison avec le Phénonip®, conservateur couramment utilisé dans l'industrie cosmétique. Les acides didymique et condidymique en particulier s'avèrent être de bons candidats pour une utilisation en tant que conservateurs. Dans un second temps, compte tenu de leur potentielle application industrielle, nous avons exploré des voies de synthèse de l'acide usnique et de la cladoxanthone A. Ainsi, la préparation de l'intermédiaire clé pour l'accès à l'acide usnique a été optimisée et les premiers essais de couplage en présence d'une porphyrine sont encourageants. De même, les voies de synthèse proposées et mises en œuvre pour la cladoxanthone A sont prometteuses.

Mots-clé : Lichen, *Usnea florida*, *Cladonia incrassata*, *Flavoparmelia caperata*, fractionnement bioguidé, métabolites secondaires, activité antimicrobienne, conservateurs, synthèse biomimétique.

Research of antimicrobial molecules from lichens

Phytochemical study of three lichens and synthetic approach of two active compounds

Abstract: Phytochemical study of three lichens collected in Limousin, *Usnea florida*, *Flavoparmelia caperata* and *Cladonia incrassata*, led to the isolation and the structural identification of 16 secondary metabolites. First, these lichens were chosen after a preliminary screening performed on 17 species. Antimicrobial activity of acetone extracts was evaluated and bioassay-guided fractionation was performed. The two isomers of usnic acid, 3 dibenzofurans, 4 depsides, 3 depsidones, one aliphatic acid and one sterol were isolated. A trichlorinated xanthone, named cladoxanthone A, was extracted and identified for the first time in a natural source. A bioautographic protocol was used to evaluate antibacterial activities of these compounds on *Staphylococcus aureus*. MICs of the products obtained in sufficient amounts were determined by a broth microdilution method in parallel with Phenonip®, a preservative commonly used in cosmetic industry. Didymic and condidymic acids were found to be good candidates for use as preservatives. Secondly, owing to their potential industrial application, we explored synthetic routes for usnic acid and cladoxanthone A. Thus, the preparation of the key intermediate for access to usnic acid was optimized and the first coupling tests in the presence of a porphyrin were encouraging. Similarly, the proposed synthetic routes for cladoxanthone A are promising.

Keywords: Lichens, *Usnea florida*, *Cladonia incrassata*, *Flavoparmelia caperata*, bioassay-guided fractionation, secondary metabolites, antimicrobial activity, preservatives, biomimetic synthesis.